الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للبكتريا

م. م. عباس حميد شكور الونداوي أ. د. لمى عبد الهادي زوين

(LIA) Test

(ONPG) Test

(MR-VP) Test

(LAP) Test

(PYR) Test

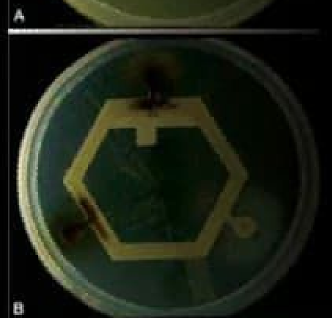
(CAMP) Test

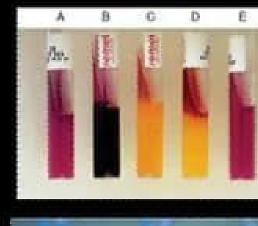
(MUG) Test

(TSI) Test













الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للبكتريا
م. م. عباس حميد شكور الونداوي أ. د. لمى عبد الهادي زوين

الطبعة الأولى ١٤٤١ هـ ٢٠٢٠ م

الاختبارات الكيموحيوية

التشـــــخصية للبكتريا

الاختبارات الكيموحيوية التشـــــخصية للبكتريا

م.م.عباس حميد شكور الونداوي   ا.د.لمى عبد الهادي زوين

١٤٤٢ هـ   الطبعة الاولى   ٢٠٢١ م

الونداوي , عباس حميد شكور / زوين , لمى عبد الهادي
الاختبارات الكيموحيوية التشخصية للبكتيريا
رقم الإيداع في دار الكتب والوثائق - بغداد: (2020 \ 2698)
المقوم اللغوي: م. ناهدة غازي علوان / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / جامعة بغداد
ISBN: 978-9922-631-60-8 الرقم الدولي
تم إعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دار الذاكرة للنشر والتوزيع

الطبعة الأولى
٢٠٢١



بغداد – الصرافية – مجاور الجسر الحديدي
نقال: ٠٧٨٠٠٧٤٠٧٢٨ / ٠٧٧٠٠٤٨٨٧٨٠
بريد إلكتروني: info@althakera.com / www.althakera.com

الاهداء

الى من نشتاق اليه بكل جوارحنا ....وطننا الغالي العراق
الى من كانوا لنا سندا وشدوا ازرنا ....افراد اسرتنا
الى كل من دعا لنا بالخير ....المخلصين

المؤلفون



(يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

صدق الله العظيم

[المجادلة: ١١].

قائمة المحتويات

بسم الله الرحمن الرحيم

مقدمة :-

تكون المعلومات الأولية التي يعتمدها اخصائيو الأحياء المجهرية في عملية التصنيف هي الوصف الماكروسكوبي Macroscopic للمستعمرة ، أو الشكل الخارجي للمستعمرةColony morphology ، ويمكن ان يشمل تحلل الدم (إن وجد) ، الصبغة (إن وجدت) ، الحجم ، النسجة (معتم أونصف شفاف أو شفاف) والعديد من الخصائص الأخرى.، وبعد الملاحظة الدقيقة للمستعمرات تستعمل صبغة كرام لتقسيم البكتيريا على مجموعتين واسعتين بالاعتماد على تفاعل صبغة كرام و الشكل الخلوي الخارجي للبكتيريا الموجبة او السالبة لصبغة كرام مثلا (المكورات الموجبة لصبغة كرام او العصويات السالبة لصبغة كرام). اما البكترياالموجبة لصبغة كرام فيجب أن يتبع صبغة كرام اختبار الكاتليز ويتبع البكتريا السالبة لصبغة كرام اختبار أوكسيديز، فضلا عن هذه الاختبارات البسيطة فان النمو في وسط الماكونكي MacConkey ، إذا كانت العزلة عبارة عن عصيات rod او عصيات مكورة coccobacillus سالبة لصبغة كرام وهذا يساعد عالم الأحياء المجهرية على تعيين الكائن الحي إلى إحدى الفئات الأساسية.

تنجز البكتيريا أنشطتها الكيموحيوية المختلفة (النمو والتكاثر) باستعمال المواد الخام (المغذيات) التي يتم الحصول عليها من البيئة، وتحدث التحولات الكيموحيوية داخل الخلايا البكتيرية وخارجها بفعل محفزات بيولوجية تدعى بالإنزيمات. يقدم هذا الجزء من الكتاب التجارب أو الاختبار لبعض الأنشطة الكيموحيوية للبكتيريا من خلال مراقبة قدرة البكتيريا على استعمال الإنزيمات وتحلل الكربوهيدرات والدهون والبروتينات والأحماض الأمينية و غالبًا ما ينتج التمثيل الغذائي او استعمال الجزيئات العضوية منتجات عرضية يمكن اعتمادها في تحديد وتوصيف البكتيريا.

قد يهمك أن تعرف أنه على الرغم من أن الاختبارات الكيموحيوية تفرق بين البكتيريا بناءً الى الخصائص الفسيولوجية ، فإن العديد من هذه الاختبارات تحدث عن طريق إجراء تقييم نوعي بسيط لدرجة الحموضة، اذ يمكن للكائن الحي القيام بتفاعل أو سلسلة من التفاعلات ، ولكن مهما كانت الكيمياء معقدة ، فإن تقييم الاختبار غالبًا ما يكون مجرد اختبار بسيط لمعرفة ما إذا تم تكوين حمض أو قاعدة. تتضمن الاوساط الزرعية مؤشرات لونية عادة مثل احمر الفينول henol

red والبروموكريزول الارجواني Bromcresol purple او بروموثايمول الاخضر Bromthymol green لتغيير اللون عند تغير الاس الهيدروجيني .ان سبب اضافة الأصباغ المختلفة هو أن كل منها يعمل بالشكل أفضل على نطاق الأس الهيدروجيني المحدد ويسمح بتصميم الاوساط الزرعية مع نوع البكتيريا التي يتم اختبارها.

تفضل البكتيريا الفموية مثلا بيئة حامضية (الاس الهيدروجيني ٤) بينما تفضل البكتيريا المعوية بيئة متعادلة (الاس الهيدروجيني ٧). من الواضح أن هناك تفاعلات أيضية أكثر مما يمكن مناقشته في هذا الكتاب ، لكننا اعتقدنا أنه سيكون من المفيد مناقشة القليل من الكيمياء المستخدمة عند استعمال اوساط الاختبار التفريقي. معرفة سبب تشكل بعض النواتج الأيضية وتأثيرها في بيئتها يمكن أن يكون مفيدًا جدًا. يكون تغيير الرقم الهيدروجيني مؤشراً ممتازاً على تكون نواتج أثناء النشاط الأيضي، وعلى هذا النحو ، فهو يعد أداة مفيدة للغاية في علم الأحياء الدقيقة التشخيصية وان المبدأ بسيط هو تغير الاس الهيدروجيني (كما يتضح من تغير اللون) في اتجاه واحد يبين ان الكائن انتج شيئا واحدأ و إذا تغير الرقم الهيدروجيني في الاتجاه الآخر يبين ان الكائن الحي قام بشيء آخر و اذا لم يتغير اللون فهذا يحدد عدم حدوث تفاعل او عدم نمو البكتيريا وبهذا تسمح الاوساط الزرعية بملاحظة التغير في مسارات الايض الميكروبية التي تتمثل في عملية التمثيل الغذائي الميكروبي هو التخمر fermentation.

ينتج التخمر الميكروبي ثلاثة من المنتجات الاساسية وهي : الغاز والكحول والأحماض. يمكن أن يكون الغاز (غالبًا على الشكل ثاني أكسيد الكربون CO_2) مؤشرًا سهلاً للتخمر لأنه من السهل رؤيته بفعل أنبوب صغير مقلوب يدعى (أنبوب درهام Durham tube) ، اما الكحول المنتج من التخمر فيكون سائلا وعديم اللون ، لذلك لا يمكن رؤيته بالعين المجردة، ولأنه لا يتأين في الماء يكون له تأثير ضئيل وإن وجد على الأس الهيدروجيني للوسط الزرعي، في حين ان الأحماض الضعيفة (حمض الاستك Acetic acid ، وحمض البروبيونيك Propionic acid ، وحمض الفورميكFormic acid ، وحمض السكسينيك Succinic acid ، وحمض بيوتاريكButyric acid) لها تأثير كبير في الأس الهيدروجيني لأي وسط زرعي ويمكن الكشف عنها بسهولة عن طريق إضافة أحدى الصبغات

كما حددتها نظرية برونستيد / لوري Brønsted/Lowry theory للأحماض والقواعد هي مواد تهب أيونات الهيدروجين (H +) بينما القواعد هي مواد تقبل أيونات الهيدروجين و تسمى جميع الأحماض المذكورة أعلاه بالأحماض الكربوكسيلية carboxylic acids لأنها تحتوي على مجموعة الكربوكسيل – COOH ونظرًا لأن الأحماض الكربوكسيلية يمكن أن توجد إما R – COOH

أو –R – COO ، يقال أنها أزواج مترافقة اذ ان R – COOH هو حامض الاتحاد و –R – COO هو قاعدة الاتحاد. وكما في التفاعل النموذجي

$$R–COOH + H_2O \rightleftharpoons R–COO^- + H_2O + H^+$$

اذ عندما يكون التفاعل إلى اليمين يتم إطلاق أيونات الهيدروجين في الوسط وهذا يقلل من درجة الاس الهيدروجيني، و على العكس من ذلك فإن إزالة أيونات الهيدروجين أو إضافة أيونات الهيدروكسيد (OH-) إلى الماء ترفع درجة الاس الهيدروجيني.

الطريقة النموذجية التي يرفع بها الكائن الحي الأس الهيدروجيني في التخمر وأوساط النمو الأخرى هي تحطيم البروتينات، اذ يؤدي تحطيم البروتينات إلى زيادة الأس الهيدروجيني للوسائط لأن التفاعل يطلق الأمونيا ، التي تتفاعل أيضًا مع الماء لتكوين الأمونيوم وأيونات الهيدروكسيد. كما في المعادلة الاتية

$$NH_3 + H_2 \rightarrow NH_4 + OH^-.$$

تحتوي الاوساط التفريقية خليطا من مواد كيميائية وعضوية لاستغلال قدرات البكتيريا المختلفة لأدائها بالشكل لايمكن التعبير عنه في الطبيعة و على الرغم من أن البكتيريا قد لا تخفض جذريًا درجة الحموضة الخاصة بالبيئة الطبيعية له (بسبب قلة توفر المادة الاساس او التنافس على هدم البروتين) اذ يمكننا التلاعب بها للقيام بذلك في المختبر عن طريق زراعتها في وسط يحتوي نسبة عالية من سكر معين أو مادة أخرى. وعندما تتم مقارنة مجموعة من الكائنات الحية المعزولة غير المعروفة ، غالبًا ما تصبح الاختلافات مرئية

اختبار استهلاك الاسيتامايد Acetamide Utilization

الغرض من الاختبار Purpose

التفريق بين الكائنات الحية الدقيقة التي لها القدرة على استعمال الأسيتاميد كمصدر وحيد للكاربون.

مبدأ الاختبار Principle

تنمو على هذا الوسط البكتريا التي لها القدرة على افراز انزيم acylamidase الذي ينزع المجموعة الامينية من acetamide لتحرير الامونيا. مما يؤدي الى زيادة قلوية الوسط فيتغير لونه من الاخضر الى الازرق الغامق المائل الى الارجواني.

الوسط :Media

حضر بأذابة (٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl، (١غم) فوسفات الأمونيوم ثنائية الهيدروجين NH4H2PO4، (١غم) فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K2HPO4 ، (٠,٨ غم) كاشف البروموثايمول الازرق bromthymol blue ، (١٠غم) acetamide ،(١٥غم) الاكار agar ،في كمية من الماء المقطرويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب وتترك لحين تصلبها (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم يعقم).

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية بعمر ١٨- ٢٤ ساعة .
٢- يلقح الوسط المائل للاسيتامايد acetamide slant بالمزرعة البكتيرية بأستعمال ناقل معدني (Loop).
٣-تحضن في ظروف هوائيا في درجة حرارة (٣٥ -٣٧) م° لمدة تصل إلى ٤ أيام.

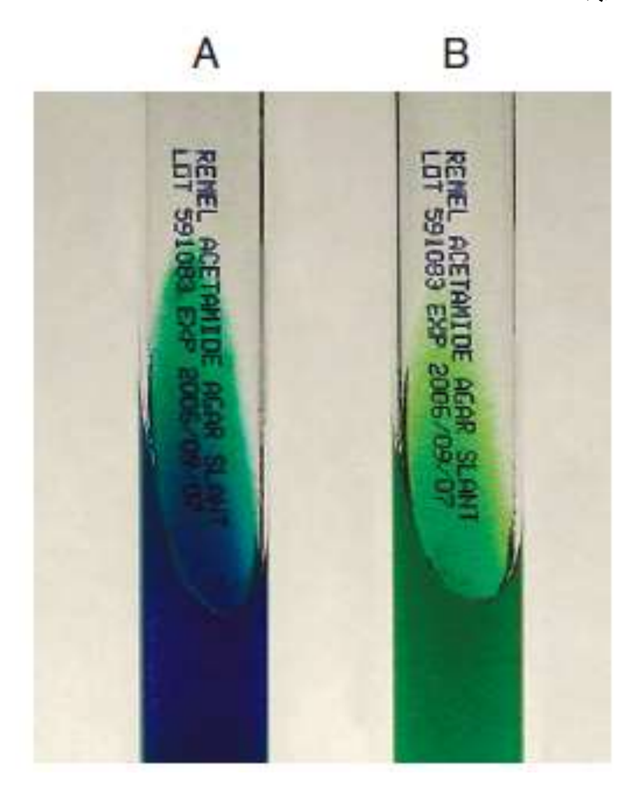
النتائج المتوقعة Expected Results

* تغيير لون الوسط الى الازرق يدل على ايجابية الاختبار .الشكل (١-A)
* عدم تغير لون الوسط يدل على سلبية الاختبار .الشكل (١-B)

ملاحظات

١- ظهورالنمو بدون تغير لون الوسط قد يشير إلى إيجابية الاختبار .

٢- عدم ظهور اللون بعد انتهاء مدة الحضن يفضل اعادة الاختبار وذلك بتقليل كمية اللقاح المستعمل .
٣- يفضل عدم استعمال مزرعة سائلة وذلك بسبب كثافة النمو مما يؤثر في النتيجة.



الشكل (١) النمو البكتيري على وسط الستر مايد الصلب Acetamide agar
A: نتيجة موجبة Positive ، B: نتيجة سالبة Negative.

اختبار استهلاك الخلات Acetate Utilization

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل الوسط لتمييز الكائنات الحية التي لها القدرة على استعمال الخلات acetate كمصدر وحيد للكربون. ويستعمل بالشكل عام للتمييز بين بكتيريا *Shigella* spp. عن بكتيريا *Escherichia coli*.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين الكائنات الحية القادرة على استعمال الخلات كمصدر وحيد للكربون، ممايؤدي الى قلوية الوسط الزرعي مغيرا لون الكاشف من الاخضر الى الازرق.

الوسط :Media

أذابة(٢غم) خلات الصوديوم ثلاثية الماء$C_2H_3NaO_2$، (٠,١غم) كبريتات المغنيسيوم MgSO4، (٥غم) كلوريد الصوديوم NaCl، (١غم) فوسفات الأمونيوم ثنائية الهيدروجين NH4H2PO4 ، (١غم) فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K2HPO4،(٢٠غم) اكار agar ، ، (٠,٨ غم) البروموثايمول الازرق bromthymol blue، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧, ٦ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١°م وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة ثم يوزع في انابيب وتترك لتتصلب (ملاحظة يفضل يوزع الوسط في انابيب ثم يعقم).

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية بعمر ١٨- ٢٤ ساعة .
٢- يلقح وسط الخلات المائل Acetate slant بمزرعة بكتيرية غير كثيفة بأستعمال ناقل معدني (needle).
٣- تحضن في ظروف هوائيا في (٣٥ -٣٧) م° لمدة تصل إلى ٧ أيام.

النتائج المتوقعة Expected Results

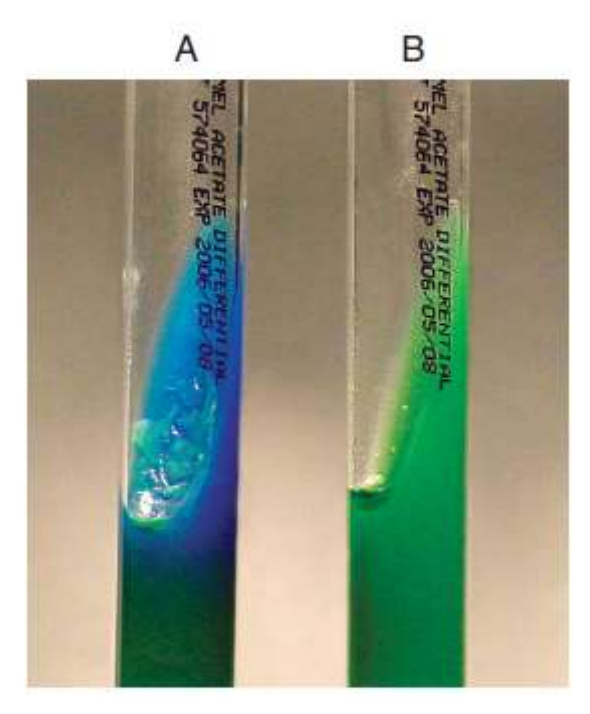
* نمو وتغيير لون الوسط الى الازرق يدل على ايجابية الاختبار .الشكل (٢-A)

* عدم نمو وعدم تغير لون الوسط يدل على سلبية الاختبار .الشكل (٢-B)

الملاحظات

١- بعض سلالات *E. coli* تستهلك الخلات بمعدل بطيء أو لا تستهلكه ، مما يؤدي إلى خطأ في عملية التشخيص .

٢- يفضل عدم استعمال مزرعة سائلة وذلك لكثافة النمو مما تؤثر في النتيجة.



الشكل (٢) النمو البكتيري على وسط الخلات الصلب Acetate agar

A نتيجة موجبة Positive ، B نتيجة سالبة Negative.

اختبار حساسية الباسيتراسينBacitracin Susceptibility

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار في التشخيص التخميني والتمييز بين بكتيريا العقدية القيحية مجموعة A الحساسة (Streptococcus *pyogenes*- susceptible group A) المحللة للدم نوع بيتا والانواع الاخرى من البكتيريا العقدية. كما أنها تستعمل للتمييز بين أنواع المكورات العنقودية (المقاومة) من المكورات الدقيقة Micrococci (الحساسة) للباستراسين.

مبدأ الاختبار Principle

يثبط المضاد الحيوي باسيتراسين Bacitracin بناء جدار الخلية البكتيرية. اذا يستعمل قرص (TaxoA) الحاوي (٠,٠٤) وحدة من المضاد باسيتراسين، اذ يوضع القرص على سطح الطبق الزرعي ويتم انتشار المضاد في الوسط الزرعي و بعد مدة الحضن تفحص الاطباق المزروعة والتحري عن مناطق التثبيط zones inhibition حول قرص مضاد الباسيتراسين.

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية بعمر ١٨- ٢٤ ساعة .
٢- تنقل مستعمرة او اثنيين بأستعمال ناقل معدني وتنشر على سطح طبق اكار الدم Blood agar بطريقة التخطيط الكثيف.
٣- يوضع قرص المضاد الباستراسين Bacitracin باستعمال ملقط معقم بالحرارة في منطقة التخطيط البكتيري برفق والتأكد من الاتصال الكافي للقرص مع سطح اكار الدم.
٤- تحضن الاطباق في درجة (٣٥ -٣٧) م° لمدة (١٨ - ٢٤) ساعة في ظروف هوائية بالنسبة للمكورات العنقودية Staphylococci وفي (٥-١٠)% ثائي اوكسيد الكربون CO_2 للمكورات العقديةStreptococci.
٥- تقاس منطقة التثبيط zones inhibition حول القرص بالمليمترات

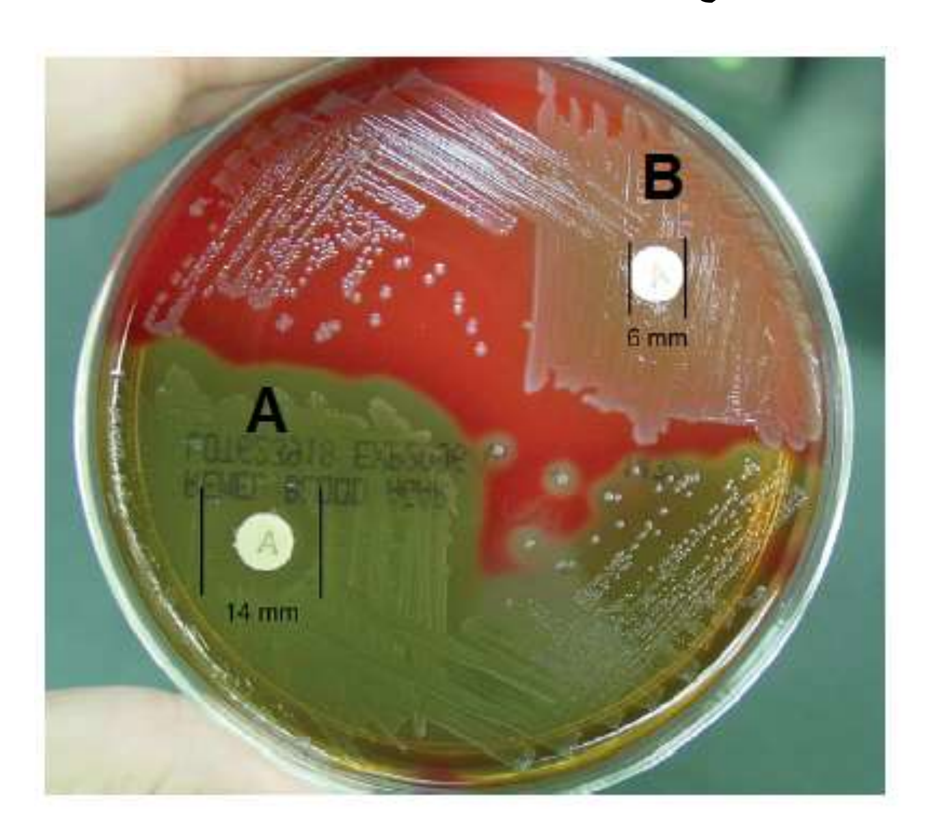
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة موجبة (حساسة) اذا كانت منطقة التثبيط اكثر من ١٠ملم حول القرص، الشكل(A-3).

* النتيجة سالبة (مقاومة) عدم وجود منطقة تثبيط،الشكل(٣- B).

الملاحظات

١- تعتمد النتيجة على سلامة القرص.
٢- يجب أن تكون الاقراص ضمن صلاحية الاستعمال مع متابعة تواريخ التخزين باستمرار



الشكل (٣) اختبار اختبار حساسية الباستراسين Bacitracin Susceptibility

A:منطقة تثبيط موجبة(حساسة) *Streptococcus pyogenes*
B : منطقة تثبيط سالب (مقاومة) *Streptococcus agalactiae*.

اختبار حساسية نوفوبايوسين NovobiocinSusceptibilityTests

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل اختبار حساسية النوفوبايوسين للتمييز بين انواع بكتيريا المكورات العنقودية Staphylococci السالبة لتخثر الدم coagulase negative ، وغالبا يستعمل في التعرف على بكتيريا *Staphylococcus saprophyticus* المقاومة للنوفوبايوسين Novobiocin .

مبدأ الاختبار Principle

النوفوبايوسين هو مضاد حيوي ينتج بوساطة بكتيريا *Streptomyces niveus* الذي يتداخل مع فعالية انزيم ATPase و انتاج الـ ATP . يستعمل في هذا الاختبار قرص ذو تركيز (٥ مايكروغرام) الذي يكون منطقة شفافة بقطر (١٦ ملم) او اكثر والتي تعد حساسة للنوفوبايوسين.

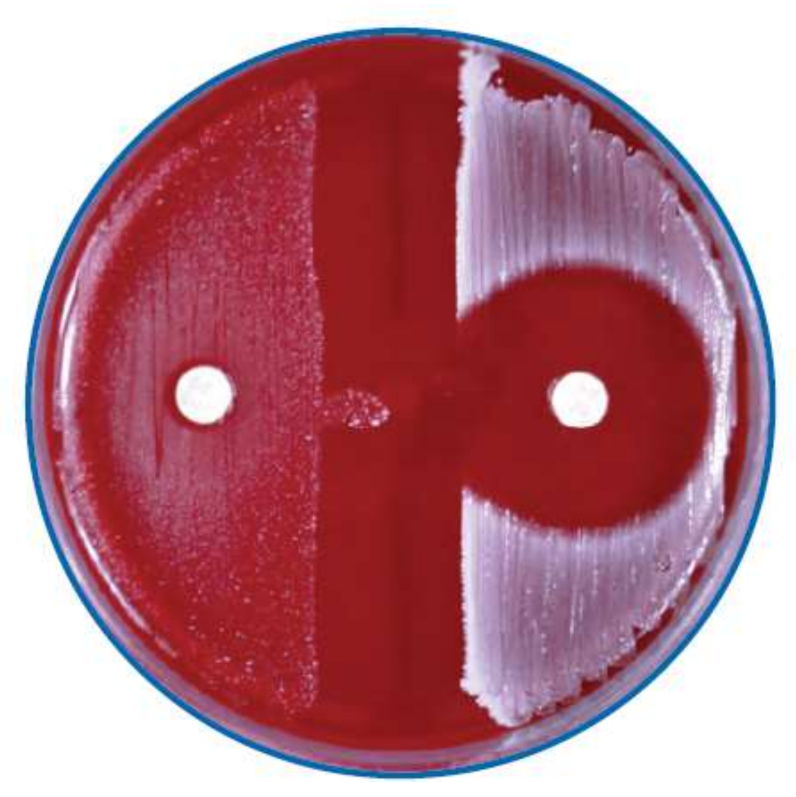
طريقة العمل Method

١- يقسم طبق اكار الدم Blood agar على اقسام متساوية ويلقح بالبكتيريا المراد اختبارها ، وبوساطة قضيب ناقل قطني (كل قسم بنوع بكتيري)
٢- يترك الطبق لمدة خمس دقائق للسماح للقاح البكتيري السائل بالانتشار بالاكار.
٣- يوضع قرص المضاد الحيوي برفق في وسط المنطقة الحاوية على الزرع البكتيري باستعمال ملقط معقم مع التأكد من ملامسة القرص بالشكل كامل مع سطح الاكار . تعاد الخطوة نفسها بالنسبة للاجزاء الاخرى من الطبق.
٤- تحضن الاطباق في ظروف هوائية بدرجة حرارة (٣٥) م° لمدة (٢٤-٤٨) ساعة.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة :منطقة تثبيط بقطر (١٦ ملم) او اكثر تعد البكتيريا حساسة للمضاد. الشكل (٤) الجانب الايمن.

* النتيجة السالبة :منطقة تثبيط اقل من (١٦ملم) اوعدم وجود تثبيط تعد البكتريا مقاومة للمضاد. الشكل (٤) الجانب الايسر.



الشكل (٤) اختبار قرص Novobiocin. على الجانب الايمن بكتيريا حساسة . على الجانب الايسر بكتيريا مقاومة .

اختبار السكولين والصفراء Bile Esculin Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتعرف االتخميني للمكورات المعوية Enterococciوالكائنات الحية الموجودة ضمن مجموعة المكورات العقدية البقرية Streptococcus bovis group. ويستعمل لتميز المكورات المعوية Enterococci والمكورات العقدية لمجموعة D(group D streptococci) عن المكورات العقدية غير مجموعة D(non–group D viridans streptococci).

مبدأ الاختبار Principle

البكتيريا الموجبة لصبغة كرام عدا بعض Streptococci وEnterococci التي يثبط نموها بسبب وجود مادة الاملاح الصفراء في الوسط

الزرعي. بأمكان الكائنات الحية النمو في وسط يحوي ٤% املاح الصفراء وهي قادرة على تحلل الاسكولينesculinمائيا الى الاسكولتينesculetin ، اذ يتفاعل الاسكولتين مع الحديد الثلاثي التكافؤ Fe3 + ليكون راسب بني غامق مائل السواد .

الوسط :Media

أذابة (١١غم) من خلاصة اللحم البقري Beef extract و(٣٤,٥غم) جيلاتين محللا انزيمياenzymatic digest of gelatin و(١غم) اسكولينEsculin و (٢غم) صفراء الثور ox bileو (٠,٥غم) سترات الامونيوم الحديدية Ferric ammonium citrate و (١٥غم) اكار ، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل الاس الهيدروجيني ٦,٦ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية بعمر ١٨- ٢٤ ساعة .
٢- يلقح الوسط المائل Bile Esculin بمزرعة بكتيرية بأستعمال ناقل معدني (Loop).
٣- حضن في ظروف هوائية لمدة (٤٨) ساعة في (٣٥ -٣٧) م°.

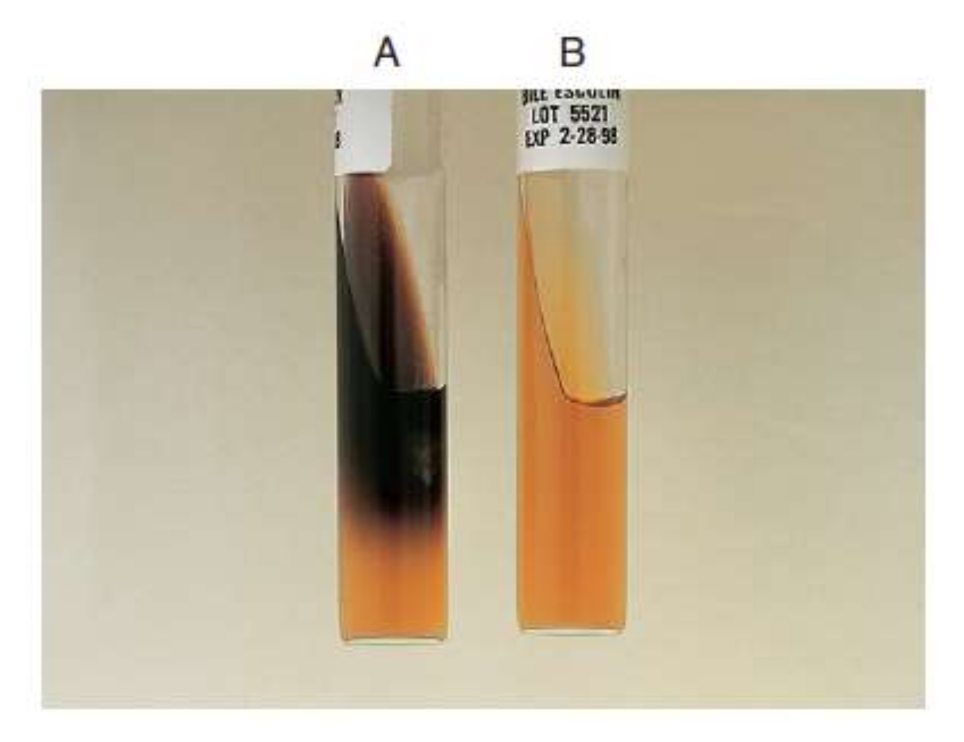
النتائج المتوقعة Expected Results

* ظهورنمو مع اسوداد سطح الوسط الزرعي المائل فهذا يدل على ايجابية الاختبار .الشكل (5A).

* عدم ظهورنمو وعدم اسوداد سطح الوسط الزرعي المائل فهذا يدل على سلبية الاختبار. الشكل(5B).

الملاحظات

تنمو بعض البكتيريا بالشكل ضعيف أو لا تنمو على الوسط الزرعي حسب المتطلبات الغذائية



الشكل (٥) وسط صفراء السكولين الصلب Bile Esculin agar

، Aموجب Positive، B سالبNegative.

اختبار ذوبانية الصفراء Bile Solubility Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبارفي التمييز بين بكتيريا العقدية الرئوية موجبة -الذائبية (positive- soluble*Streptococcus pneumoniae*) وبكتيريا العقدية المحللة للدم نوع الفا سالبة -الذائبية Streptococcus alpha-hemolytic negative-insoluble

مبدأ الاختبار Principle

تمتاز الصفراء أو محلول املاح الصفراء(مثل sodium desoxycholate) بسرعة تحللها من قبل مستعمرات المكورات الرئوية ويعتمد التحلل على وجود انزيم التحلل الذاتي الداخل الخلوي (amidase)، وأملاح الصفراء التي تعمل على خفض الشد السطحي بين غشاء الخلية البكتيرية والوسط الزرعي ، مما يعمل على تسريع الانحلال الذاتي الطبيعي للكائن الحي.

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية نامية على وسط اكار الدم Blood agar الحاوي ٥% من دم الخروف بعمر ١٢-٢٤ ساعة .
٢- يوضع (١-٢) قطرة من محلول sodium desoxycholate بتركيز (١٠%) على المستعمرة جيدة النمو ، اذ تغمر المستعمرة (Gently wash)دون ازاحتها من الاكار.
٣- يحضن الطبق بدرجة (٣٥-٣٧) م° لمدة (٣٠) دقيقة.
٤- اختبار الوسط عن طريق وجود او عدم وجود تحلل للمستعمرة .

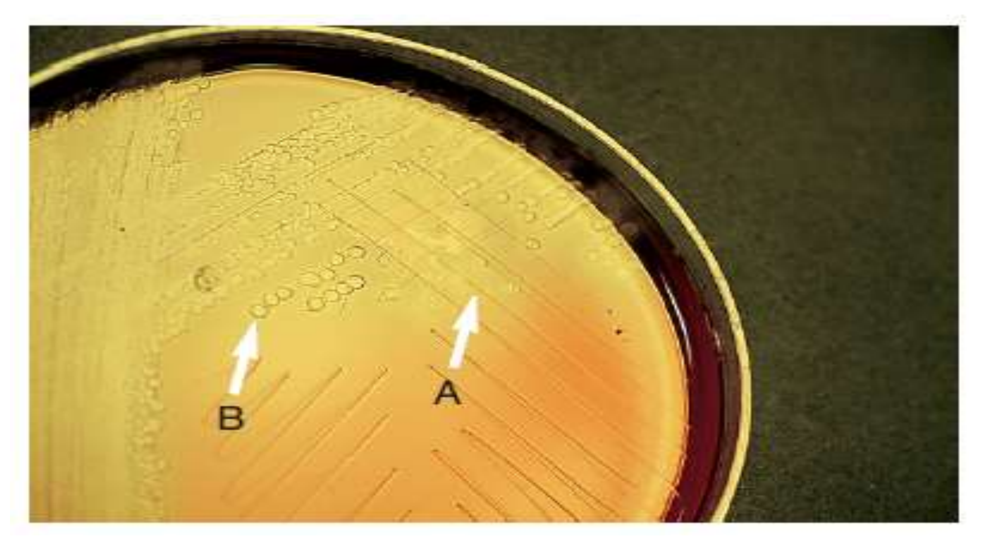
النتائج المتوقعة Expected Results

* تحلل المستعمرة يدل على ان ايجابية الاختبار ،وقد يلاحظ بقاء اثر المستعمرة المتحللة في نفس منطقة التحلل. الشكل (6-A).

* بقاء المستعمرة النامية يدل على سلبية الاختبار. الشكل(6-B).

الملاحظات

١- قد تقل فعالية الانزيم عند المستعمرات القديمة ، ولذلك فان النتيجة السالبة لبكتيريا *S.pneumoniae* يجب ان تشخص بطريقة بديلة.
٢- يستعمل (محلول ٢%sodium desoxycholate) عند اجراء الاختبار بطريقة الانابيب.



الشكل (٦) اختبار ذوبانية الصفراءBile solubility

A تحلل المستعمرة ، B مستعمرة نامية سليمة .

اختبار قرص البيوتاريت Butyrate Disk

الغرض من الاختبار Purpose

اختبار سريع للكشف عن انزيم Butyrate esterase في تشخيص بكتيريا *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

مبدأ الاختبار Principle

الكائنات الحية القادرة على إنتاج انزيم Butyrate esterase الذي يحلل bromochlorindolyl Butyrate مائيا، ويتحرر مركب Indoxyl وبوجود الاوكسجين يكون تلقائيا لون نيلي (الازرق الى الازرق – البنفسجي).

طريقة العمل Method

١- تحضر مزرعة بكتيرية بعمر ١٨- ٢٤ ساعة.
٢- يوضع قرص الاختبار على شريحة زجاجية.
٣- وضع قطرة واحدة من ماء Reagent-grade water (ماء معامل بالتقطير ،التبادل الايوني ،الضغط التناضحي اومعرض للاشعة فوق البنفسجية ومعقم باستعمال وحدات الترشيح ذات مسامية ٠,٢٢ مايكروميتر) على القرص،مع ازالة كمية الماء الزائدة منه
٤- تنقل كمية قليلة من المستعمرات بالناقل الخشبي وفركها على القرص جيدا.
٥- تحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٥) دقائق.

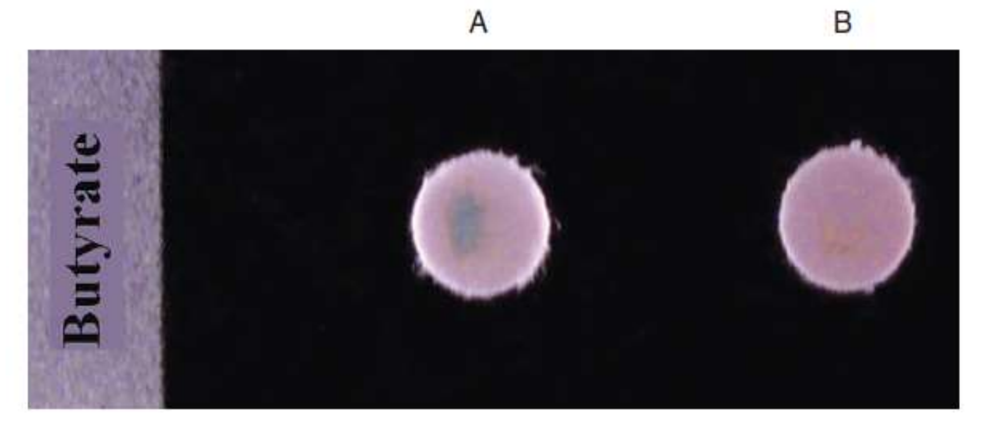
النتائج المتوقعة Expected Results

* ظهور اللون الازرق خلال (٥) دقائق يدل على ايجابية الاختبار. الشكل (7-A)

* عدم تغير اللون يدل على سلبية الاختبار سالب. الشكل (7-B)

ملاحظات

١- تكون نتيجة موجبة خاطئة اذا كان الحضن اكثر من (٥) دقائق.
٢- تكون نتيجة سالبة خاطئة اذا كانت كمية البكتيريا قليلة جدا .
٣- اذا كانت البكتريا سالبة الاختبار توخذ كمية اكبر من اللقاح البكتيري، واتباع طرق اضافية .



الشكل (٧) قرص البيوتاريت Butyrate Disk

A: موجب Positive، B: سالب Negative.

اختبار CAMP Test

الغرض من الاختبار Purpose

CAMP هو Christie, Atkins and Munch-Peterson ، يستعمل هذا الاختبار للتفريق بين بكتيريا العقدية مجموعة B (streptococcigroup B) مثل *Streptococcus agalactiae*) الموجبة الاختبار وبكتيريا العقدية الاخرى . تكون بكتيريا *Listeria monocytogenes* موجبة لهذا الاختبار .

مبدأ الاختبار Principle

تنتج بعض الكائنات الحية (بما في ذلك العقديات مجموعة B) streptococcigroup B بروتين محلل للدم قابل للانتشار خارج خلوي يسمى (عامل CAMP) الذي يعمل بالشكل تأزري مع تحلل بيتا للمكورات العنقودية الذهبية *Beta lysin Staphylococcus aureus* لتسبب تحلل كريات الدم الحمراء. يلقح وسط الدم الصلب ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية بالشكل خط افقي ثم تلقح ببكتيريا العقديات مجموعة B بالشكل خط عمودي على خط الافقي للبكتريا العنقودية .فيظهر تفاعل ايجابي كرأس سهم في منطقة التقارب بين الخطين المزروعين.

طريقة العمل Method

١- زرع خط افقي من بكتيريا *Beta lysin Staphylococcus aureus* في وسط طبق اكار الدم.

٢- زرع خط عمودي من البكتيريا المراد اختبارها بالشكل عمودي بمسافة (٢)ملم من خط *S. aureus* .

٣- حضن الطبق هوائيا بدرجة (٣٥-٣٧) م° لمدة ٢٤ ساعة

النتائج المتوقعة Expected Results

* الموجب : تكوين الشكل رأس سهم في منطقة التحلل بين الخطين المزروعين،الشكل (8-A).

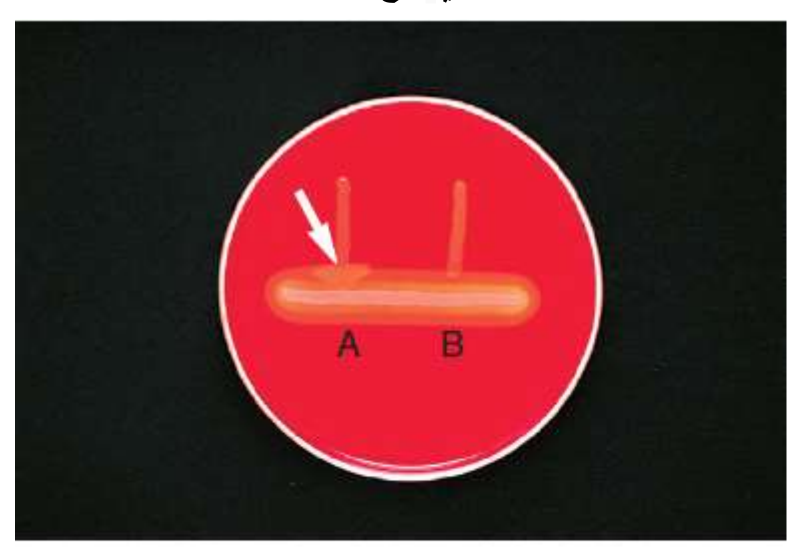
* السالب : عدم تكوين الشكل راس سهم في منطقة التحلل بين الخطين المزروعين، الشكل (8-B).

الملاحظات

١- يمكن اجراء الاختبار لاكثر من نوع بكتيري على طبق واحد.

٢- قد تكون نسبة صغيرة من المجموعة العقدية A لديها تفاعل موجب لاختبار CAMP .

٣- يكون الاختبار محدد للمستعمرات التي تكون من المجموعة العقدية B ولكنها محدودة التحلل الدموي نوع بيتا.



الشكل (٨) اختبار CAMP.

A النتيجة موجبة : تكون الشكل رأس السهم في منطقة التحلل بيتا للمكورات العقدية من المجموعة B.

B النتيجة سالبة : عدم زيادة التحلل الدموي وعدم تكوين الشكل راس السهم .

اختبار الكاتاليزCatalase Test

الغرض من الاختبار Purpose

يميز هذا الاختبار المكورات الدقيقة Micrococci وأنواع المكورات العنقودية Staphylococcal species إيجابية الكاتاليزمن انواع المكورات العقدية Streptococcal سلبية الكاتاليز.

مبدأ الاختبار Principle

البكتيريا الهوائية والاختيارية اللاهوائية تنتج نوعين من السموم خلال عملية الايض الحيوي وهي بيروكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide H_2O_2 وجذر الاوكسيد الحر superoxide radical(O2-). تلك البكتيريا تمتلك انزيمين يقومان بأزالة التأثير السمي الناتج من عمليات الايضية الطبيعية . احد هذه الانزيمات هو الكاتاليز الذي له القدرة على تحويل H_2O_2 الى الماء والاوكسجين. ويستدل عن وجود الانزيم في العزلات البكتيرية عند تعرضها لكمية قليلة من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز (٣٠%) ينتج عنه تكوين سريع لفقاعات الاوكسجين على الشريحة الزجاجية .

طريقة العملMethod

١- تنقل كمية قليلة من مستعمرة بكتيرية نامية باستعمال ناقل معدني او خشبي معقم الى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة.
٢- توضع قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز (٣٠%) على كمية البكتيريا فوق الشريحة.
٣- يلاحظ تكون فقاعات الاوكسجين.

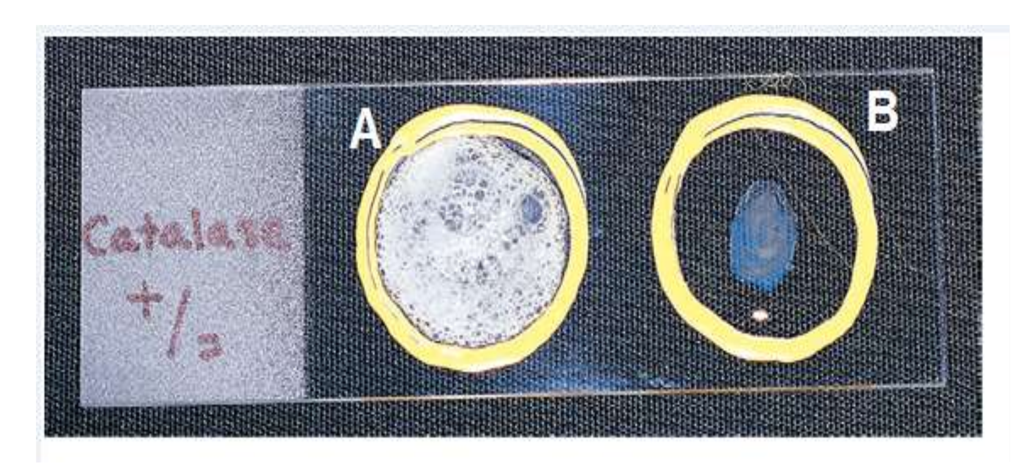
النتائج المتوقعة Expected Results

* تكون فقاعات غزيرة يدل على ايجابية الاختبار. الشكل (٩-A)

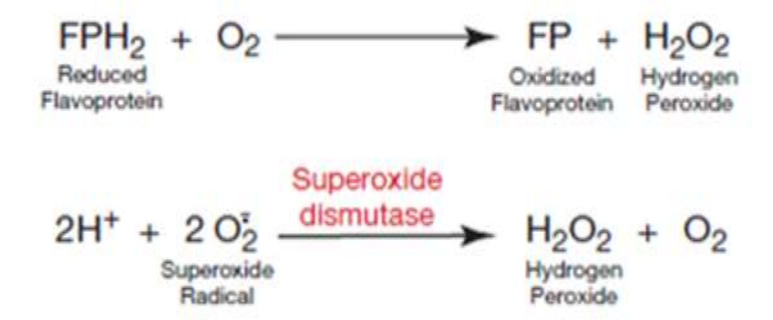
*عدم تكون فقاعات او قليلة يدل على سلبية الاختبار . الشكل (٩- B)

الملاحظات

١- بعض انواع البكتيريا (Enterococci) تنتج انزيم peroxidase الذي يحفز ببطىء عملية تجزئة H_2O_2 والاختبار ربما يعطي نتيجة موجبة ضعيفة،وتعد نتيجة غير صحيحة.
٢- النتيجة الموجبة الخاطئة تحدث اذا كانت العينة ملوثة بأكار الدم (عند اخذ كمية من المستعمرة ومعها كمية من اكار الدم).
٣- نقص أو ضعف إنتاج الفقاعة يدل على عدم وجود انزيم الكاتاليز.



الشكل (٩)اختبار Catalase A: نتيجة موجبة Positive، B: نتيجة سالبة Negative



الشكل (١٠) مخطط انتاج H2O2 :يتكون بيروكسيد الهيدروجين خلال سلسلة نقل الالكترونات من اختزال الفلافوبروتين الى الاوكسجين (معادلة ١) او بوساطة انزيم Super dismutase (معادلة ٢)

$$\underset{\text{Hydrogen Peroxide}}{2H_2O_2} \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2\,(g)$$

الشكل (١١) فعالية انزيم Catalase: يتواجد انزيم الكاتليز في البكتريا الهوائية والاختيارية غير الهوائية والبكتريا التي تحتاج الى كمية قليلة من O2 (Micraerophilies) لتحلل H2O2الى ماء وغاز الاوكسجين

اختبار السترمايد Cetrimide Agar

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار مبدئيا في عزل وتنقية بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من العينات الملوثة .

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قابلية البكتيريا على النمو بوجود السترمايد وهي مادة سامة التي تثبط نمو العديد من البكتيريا وذلك بسبب تحريرها لنتروجين والفسفور الذي يبطىء او يقتل البكتيريا . تكون بكتيريا *P.aeruginosa* مقاومة للسترمايد.

الوسط الزرعي Method

يذوب (٢٠)غم من الجيلاتين المهظوم انزيميا Enzymatic digest of gelatin و(١،٤)غم كلوريد المغنيسيوم MgCl2 و(١٠)غم من كبريتات البوتاسيوم K2SO4 و(٠،٣)غم السترمايد(cetyltrimethylammonium bromide)و(١٣،٦)غم الاكار في كمية من الماء المقطرويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧،٢ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ، ثم وزع في انابيب (او تصب اطباق) وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العملMethod

١- تحضر مزرعة بكتيرية سائلة (وسط نقيع القلب والدماغ السائل) بعمر ١٨- ٢٤ ساعة.
٢- يلقح سطح السترمايد المائل بقطرة من المزرعة.
٣- تحضن بدرجة (٣٥-٣٧)م° لمدة (٧) ايام.
٤- اختبار السطح المائل للتحري عن النمو البكتيري.

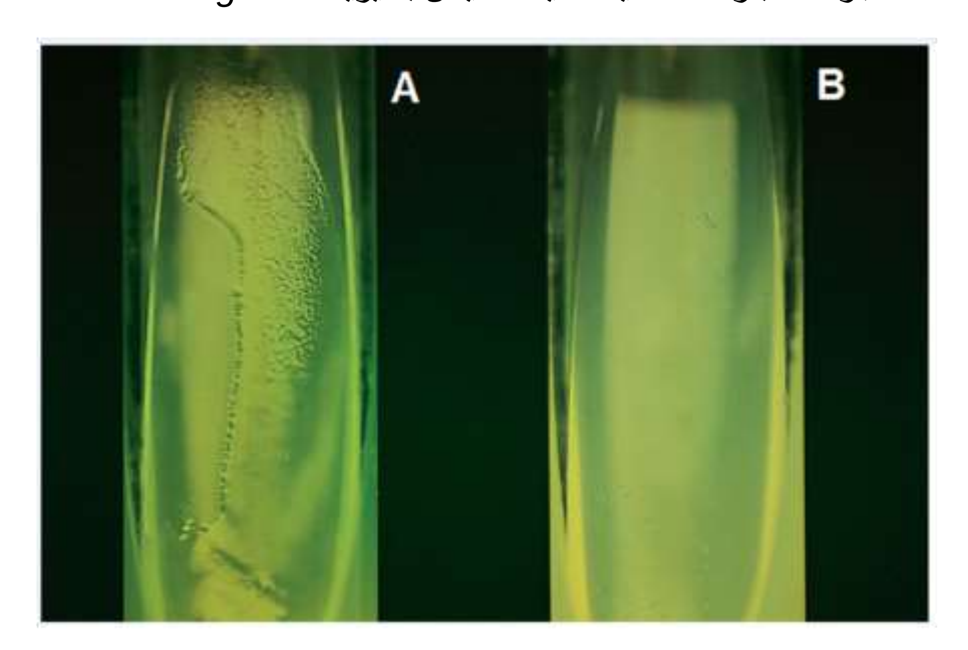
النتائج المتوقعة Expected Results

* وجود نمو بكتيري، تغير في لون المستعمرات يدل على ايجابية الاختبار. الشكل (١٢-A).

* عدم وجود نمو بكتيري يدل على سلبية الاختبار. الشكل (١٢-B).

الملاحظات

١- بعض البكتيريا المعوية تنمو وتظهر لون اصفرباهت على الوسط، وهذا التغير في اللون يجب ان يميز عن انتاج الفلورسنت (اللون المتألق).
٢- اجراء اختبارات اضافية لتأكيد تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*.



الشكل (١٢) وسط Cetrimide Agar

A: نتيجة موجبة Positive،

B: نتيجة سالبة Negative

اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص البكتيريا القادرة على استهلاك سترات الصوديوم Sodium Citrate كمصدر وحيد للكاربون ، واملاح الامونيوم غير العضوية inorganic ammonium salts كمصدر وحيد للنتروجين. يعد هذا الاختبار جزء من سلسلة من الاختبارات تدعى IMViC وهي:

(Indole , Methyl red , Voges-Proskauer , and citrate) التي تستعمل لتفريق البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae عن عصيات السالبة لصبغة كرام.

مبدأ الاختبار Principle

تنتج البكتيريا التي تنمو على هذا الوسط انزيم Citrate-permeaseالذي بامكانه تحويل الستراتcitrate الى البايروفيت pyruvate والذي يدخل في الدورة الايضية لانتاج الطاقة للبكتريا ،فضلا عن قدرة البكتيريا القادرة على النمو في هذا الوسط ان تستخدم السترات وتحول فوسفات الامونيوم ammonium phosphate الى الامونيا ammonia وهيدروكسيد الامونيوم ammonium hydroxide وجعل الاس الهيدروجيني قاعدي مما يغير لون الكاشف Bromthymol blue من الاخضر الى الازرق.

الوسط الزرعي Media

اذابة (١)غم من فوسفات الامونيوم ثنائية الهيدروجين NH4H2PO4، و(١)غم فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K2HPO4 و(٥) غم كلوريد الصوديوم NaCl و(٢)غم سترات الصوديوم Sodium Citrate و (٠,٢)غم كبريتات المغنيسيوم MgSO4 و (١٥) غم اكار و(٠,٠٨)غم بروم ثايمول الازرق bromthymol blue، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٩ و يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ،ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- يلقح سطح الوسط السيمون سترات الصلب المائل Simmons citrate agar بمستعمرة بعمر (١٨-٢٤) ساعة بوساطة needle
٢- يحضن بدرجة (٣٥-٣٧)م° لمدة (٧) ايام.
٣- ملاحظة النمو البكتيري وتغير لون الوسط الى الازرق دلالة على القلوية.

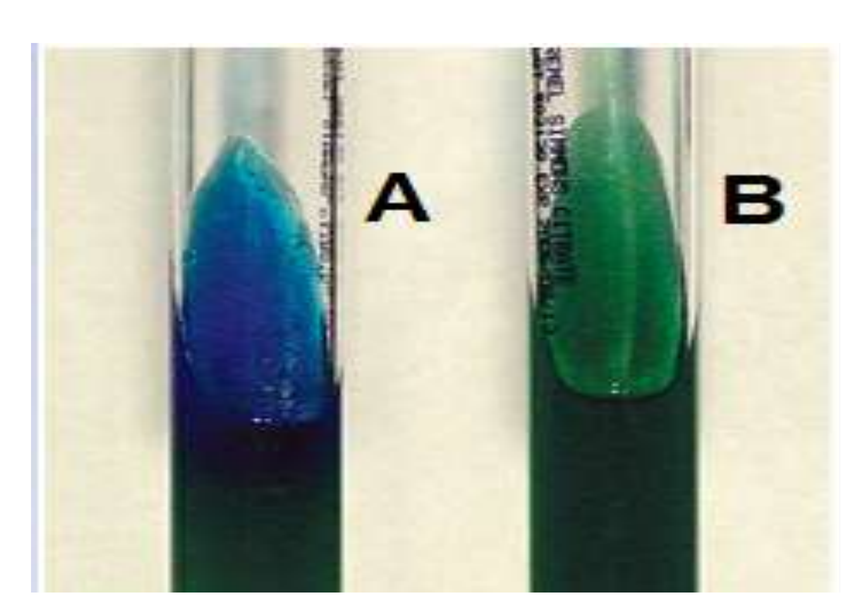
النتائج المتوقعة Expected Results

* وجود النمو على الوسط مع تغيير او عدم تغيير لون الوسط يدل على ايجابية الاختبار .الشكل(A13).

* عدم وجود نمو يدل على سلبية الاختبار .الشكل (B١٣).

الملاحظات

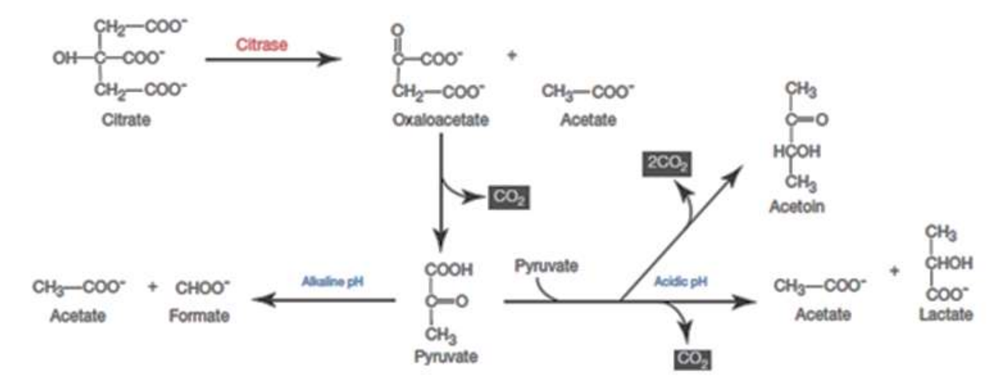
١- بعض انواع البكتيريا قادرة على النمو على وسط السترات بدون تغيرلون الوسط.
٢- نمو البكتيريا يعد نتيجة موجبة بالنسبة لاختبار السترات ، حتى وان لم يتغير لون الوسط.
٣- عدم تلقيح وسط الستريت من مزرعة نامية في وسط زرعي سائل،وذلك لكثافة اللقاح .



الشكل(١٣) وسط استهلاك السترات Citrate utilization

A: نتيجة موجبة Positive

B: نتيجة سالبة Negative



الشكل (١٤)اختبار السترات Citrate

امتلاك البكتريا انزيم Citrase،فعند دخول السترات الى داخل الخلايا يتحول بفعل الانزيم الى البايروفيت الذي يتحول بدوره الى نواتج متعددة اعتمادا على الاس الهيدروجيني للبيئة الغذائية

اختبارالتجلطCoagulase Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين المكورات العنقودية الذهبية*S.aureus* (الموجبة) وبقية المكورات العنقودية الاخرى (السالبة).

مبدأ الاختبار Principle

تنتج بكتيريا *S.aureus* الشكلين من انزيم التجلط Coagulase وهو المرتبط والحر.المرتبط او يسمى عامل التكتل Clumping factor الذي يرتبط بالجدار الخلوي للبكتيريا ويتفاعل مباشرة مع الفايبرينوجينFibrinogenوينتج عنه ترسيب الفايبرينوجين على بكتيريا المكورات العنقودية، مما يتسبب في تكتل الخلايا على البكتريا عندما يخلط المعلق البكتيري بالبلازما. ان وجود انزيم Coagulase المرتبط يرتبط مع وجود انزيم التجلط الحر، وهو انزيم الخارج الخلوي الذي يسبب بتكوين الخثرة عندما تحضن مستعمرات *S. aureus* مع البلازما، وان ألية التخثر تتضمن تنشيط عامل تخثر البلازما plasma Coagulase reacting factor -(CRF) ، الذي يحور او يشق جزيئة الثرومبين لتكوين معقد انزيم الثخثر وعامل تخثر البلازما و هذا المعقد بدوره يتفاعل مع الفايبرينوجين Fibrinogen لانتاج خثرة الفايبرين Fibrin clot.

طريقة العمل Method

A/ طريقة الشريحة الزجاجية

١- وضع قطرة من بلازما التخثر (يفضل استعمال بلازما الارانب في مادة Ethylene diamine tetra acetic acid [EDTA]) على شريحة زجاجية نظيفة وجافة.
٢- وضع قطرة من ماء المقطر او محلول الملحي على بعد مسافة معينة من قطرة البلازما واعتبارها كسيطرة .
٣- تلقح كل قطرة بالبكتريا المعزولة باستعمال ناقل معدني Loop .
٤- تمزج جيدا بقضبان الخشب او البلاستك المجهزة من قبل الشركة.
٥- تحرك (تهز) الشريحة الزجاجية برفق لمدة (٥-١٠) ثواني.

النتائج المتوقعة Expected Results

*النتيجة الموجبة : تكتل واضح في قطرة البلازما خلال (١٠) ثواني او اقل ،وعدم تكتل قطرة الماء او المحلول الملحي. الشكل(A-١٥)في الجانب الايسر.

* النتيجة سالبة : عدم تكتل اي من القطرات البلازما والماء المقطر او المحلول الملحي. الشكل (A-١٥) في الجانب الايمن .

B/ طريقة الانابيب Tube Test:

١- وضع (٠,٥) مل من البلازما (مع EDTA) في انابيب اختبار ثم تلقح بعدد من المستعمرات لتعطي معلق حليبي اللون.
٢- تحضن الانابيب في ظروف هوائية بدرجة حرارة (٣٥ -٣٧) م° لمدة (٤ ساعات).
٣- يلاحظ تكوين خثرة .

النتائج المتوقعة Expected Results

*النتيجة الموجبة: وجود تخثر بأي حجم . الشكل(١٥- B)في الجانب الايسر.

* النتيجة السالبة: لايوجد تخثر . الشكل(١٥- B)في الجانب الايمن .

الملاحظات

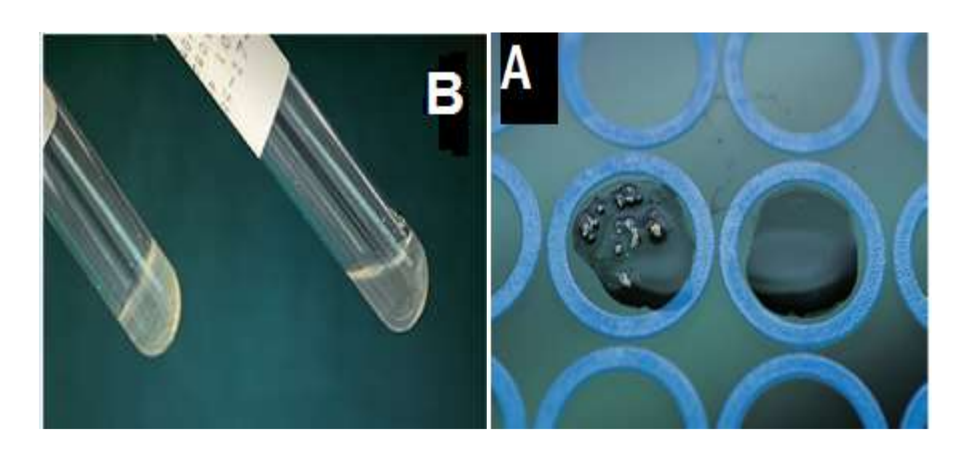
١-(طريقة الشريحة الزجاجية)

* التكتل في كلتا القطرتين يؤشر الى ان الكائن البكتيري لديه تلازن ذاتي Autoagglutinates، وهذا غير مناسب للاختبار بطريق الشرائح لتلك الكائنات

٢-(طريقة الانابيب)

*تكون نتائج الاختبار موجبة خلال ٤ ساعات وتعد النتيجة سالبة بعد (٢٤ساعة).

*اذا كانت النتيجة سالبة خلال الاربع ساعات ، فيجب حضن الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة ومن ثم ملاحظة وجود التخثر مرة اخرى



الشكل (١٥) اختبار التخثر Coagulase: A : اختبار الشريحة لعامل التكتل. في الجانب الأيسرالنتيجة موجبة ؛ في الجانب الأيمن النتيجة سالبة .B: اختبار الانابيب لعامل التكتل،الانبوب في الجانب الايسر وجود تخثر يدل الى النتيجة الموجبة ،الانبوب في الجانب الايمن عدم وجود تخثر يدل الى النتيجة السالبة

اختبار(Decarboxylase Tests (Moeller's Method

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتفريق بين البكتيريا العصوية المعوية Enterobacteriaceae والبكتيريا العصوية السالبة لصبغة كرام.

مبدأ الاختبار Principle

يقيس هذا الاختبار قدرة انزيم ديكاربوكسيليز(Decarboxylase) في الكائنات الدقيقة لنزع مجموعة الكاربوكسيلDecarboxylateمائيا من الاحماض الامينية لتكون الامينamine . بنزع الكربوكسيل ، أو التحلل المائي للحامض الاميني و ينتج عنه اس هيدروجيني قاعدي وتغيير لون الوسط من البرتقالي إلى الأرجواني.

الوسط الزرعي Media

أذابة(٥غم)من انسجة حيوانية مهضومة Peptic digest of animal tissue و(٥غم) خلاصة اللحم البقري Beef extract و(٠,١غم) بروموكريزول البنفسجية Bromcresol purple و(٠,٠٠٥غم) احمر الكريزول Cresol red و (٠,٥غم) الدكستروزDextrose و (٠,٠٠٥غم) بايردوكسالPyridoxal و (١٠غم) حامض اميني (lysine , Ornithine,Arginine) في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٠ ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ويعقم بجهاز الموصدة بدرجة ١٢١ وبضغط ١٥ باوند /انج ٢ ولمدة ١٥ دقيقة . ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل

A/ الكائنات غير المخمرة للكلوكوز *Glucose-Nonfermenting Organisms*

١- يحضر عالق بكتيري في وسط نقيع القلب والدماغ السائل (brain-heart infusion broth) من مزرعة بكتيرية بعمر (١٨-٢٤ ساعة) النامية على وسط اكار الدم الحاوي (٥%) دم ويقارن عكارة العالق وفق مقياس مكفرلاند بما يعادل اكثر من ٥ (turbidity standard(≥McFarland No. 5
٢- تلقح ثلاثة انابيب حاوية وسط الديكاربوكسيليز السائل مع (lysine،Arginine ،Ornithine) وانبوب اختبار السيطرة الغير الحاوي على حامض اميني بـ (٤ قطرات) من العالق البكتيري .

٣– يضاف زيت معدني معقم بحجم طبقة ٤ ملم لكل أنبوبة.
٤– تحضن الانابيب في ظروف هوائية في (٣٥ -٣٧) م°و اختبار الانابيب بعد (٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعة).

B/ الكائنات المخمرة للكلوكوز *Glucose-Fermenting Organisms*

١- تلقح الانابيب بقطرة واحدة من مزرعة بكتيرية بعمر (١٨-٢٤ ساعة) النامية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Brain-heart infusion broth).
٢- يضاف زيت معدني معقم بحجم طبقة ٤ ملم لكل أنبوبة.
٣- تحضن الانابيب في ظروف هوائية في (٣٥ -٣٧) م°و اختبار الانابيب بعد (٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعة).

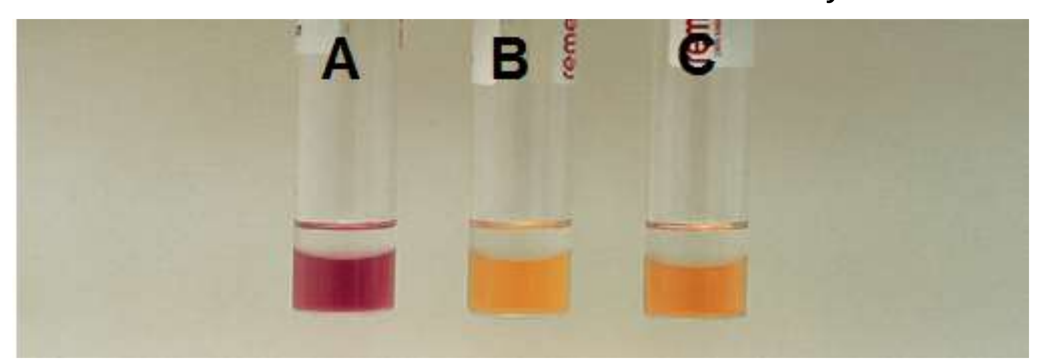
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تغير لون الوسط الى الارجواني (القاعدي) بمقارنته مع انبوب السيطرة .الشكل (١٦-A).

*النتيجة السالبة: عدم تغير اللون اويكون اصفر (حامضي) كما في انبوب السيطرة.مع وجود نمو في انبوب السيطرة الشكل(١٦-B).

الملاحظات

تخمر الدكستروز Dextrose يسبب تكون اللون الاصفر وهذا لايؤثر او يحجب اللون القاعدي الناتج من النتيجة الموجبة لتفاعل Decarboxylation.



الشكل (١٦) وسط Decarboxylase Tests (Moeller's Method)

A: نتيجة انبوب موجبة Positive

B: نتيجة انبوب سالبة Negative

C: نتيجة انبوب سيطرة غير ملقحة Uninoculated

اختبارتحلل الدنا DNA Hydrolysis (DNase)

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتفريق بين الكائنات الحية على أساس إنتاجها لانزيمDeoxyribonuclease ،اذ يستعمل للتمييز بين بكتيريا . *Serratia* sp (الموجبة) من بكتيريا .*Enterobacter*sp و *Staphylococcus aureus* (الموجبة) من الانواع الاخرى ، و بكتيريا *Moraxella catarrhalis* (موجبة) من .*Neisseria* sp.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة الكائنات الحية للتحلل المائي للدنا DNA .يكون لون الوسط اخضر شاحب بسبب معقد DNA–methyl green ،اذا عند تنمية البكتيريا على الوسط و تحلل الدنا يتلاشى اللون الاخضر وتحاط المستعمرة بمنطقة غير ملونة.

الوسط الزرعي Media

يذاب (١٠غم) من الكازيين المهضوم Pancreatic digest of casein ، (١٠غم) مستخلص الخميرة Yeast extract، (٢غم) Deoxyribonucleic acid، (٥غم) كلوريد الصوديومNaCl، (١٥غم)اكار agar ، (٠,٥غم) Methyl greenفي كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٥ ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ويعقم بجهاز الموصدة بدرجة ١٢١ وبضغط ١٥ باوند /انج ٢ ولمدة ١٥ دقيقة . ثم وزع في اطباق وتترك لحين تصلبها.

طريقة العمل Method

١- يلقح الوسط الزرعي DNase agar بالبكتيريا بالشكل خط لاختبارها وعزلها.
٢- حضن الوسط في ظروف هوائية بدرجة (٣٥-٣٧) م° لمدة (١٣-٢٤) ساعة.

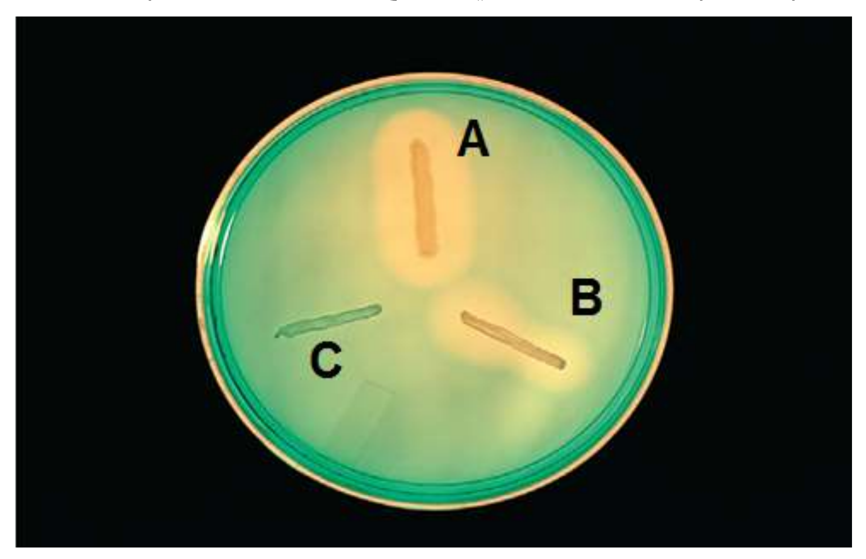
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة: تحلل الدنا مائيا ،ويتحد اخضر المثيل المتحرر مع الدنا المبلمر في اس هيدروجين ٧,٥ ، ويتغير لون الوسط حول المستعمرة البكتيرية المفحوصة الى عديم اللون.الشكل (A-B-١٧).

* النتيجة السالبة : عدم تحلل للدنا وبقاء الوسط اخضر اللون. الشكل (C-١٧).

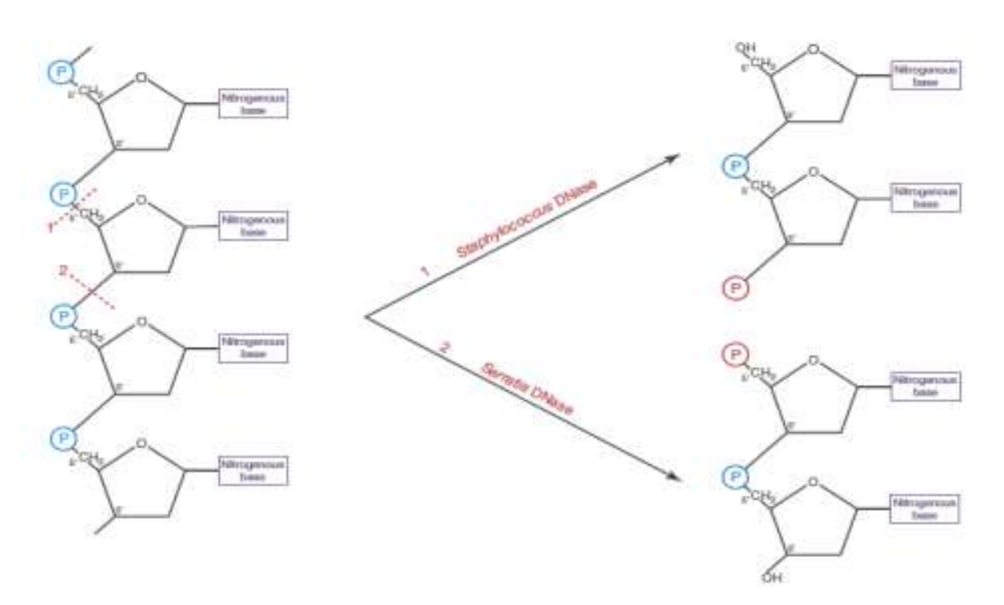
الملاحظات:

يجب تلقيح الوسط بمعلق بكتيري من مزرعة سائلة بعمر (٤ ساعات) او استعمال (١-٢مل) من محلول الملحي الملقح بمستعمرات بعمر (١٨-٢٤ساعة).



الشكل (١٧) وسط DNA Hydrolysis

A: موجب *Staphylococcus aureus*، B: موجب *Serratia marcescens.*، C: سالب.



الشكل (١٨) تحلل الدنا DNA Hydrolysis

اختبار تحلل الأسكولين Esculin Hydrolysis

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتعرف االتخميني والتمايز بين البكتيريا المعوية.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد إذا كان الكائن الحي قادرا على تحلل glycoside Esculin إلى Esculetin ،الذي يتفاعل مع ايون Fe+3 ويكون راسبا ذا لون بني داكن الى الأسود.

الوسط الزرعي Media

اذابة (٨غم) من كلوريد الصوديوم NaCl، و(٠,٤غم) فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K2HPO4، (٠,١غم) فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH2PO4، (٥غم) اسكولينEsculin ، (٠,٥غم) Ferric ammonium citrate، (١٥غم) اكار، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٧ ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ويعقم بجهاز الموصدة بدرجة ١٢١ و١٥بضغط باوند /انج ٢ ولمدة 15 دقيقة. ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- يلقح الوسط بقطرة واحدة من مزرعة سائلة بعمر (٢٤ساعة).
٢- حضن الوسط بظروف هوائية بدرجة (٣٥-٣٧) م°لمدة (٧أيام).
٣- اختبار تكون اللون الاسود في الوسط الزرعي و اختبار تحت الاشعة فوق البنفسجية بمصباح وود(Wood’s lamp) للكشف عن التحلل المائي للأسكولين.

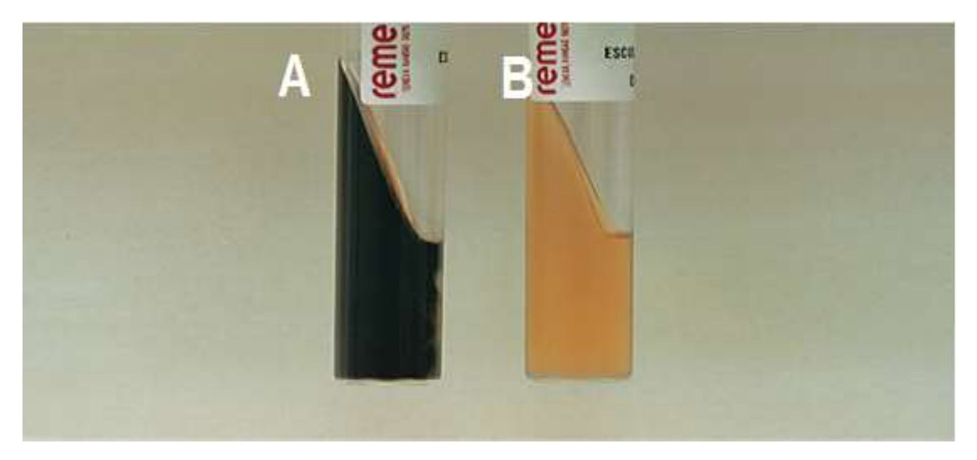
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة: اسوداد الوسط الزرعي مع فقدان التالق الضوئي تحت مصباح Wood، الشكل(١٩-A)

* النتيجة السالبة: عدم اسوداد الوسط الزري او اسوداد طفيف مع عدم فقدان التألق الضوئي الشكل(١٩- B)

الملاحظات :

١- يعد وسط Esculin hydrolysis غير انتقائي.
٢- يعد وسط Bile esculin hydrolysis انتقائيا وتفريقيا



الشكل (١٩) وسط Esculin hydrolysis

A : انبوب موجب بتكون اللون الاسود ،

B: انبوب غير ملقح بالبكتيريا.

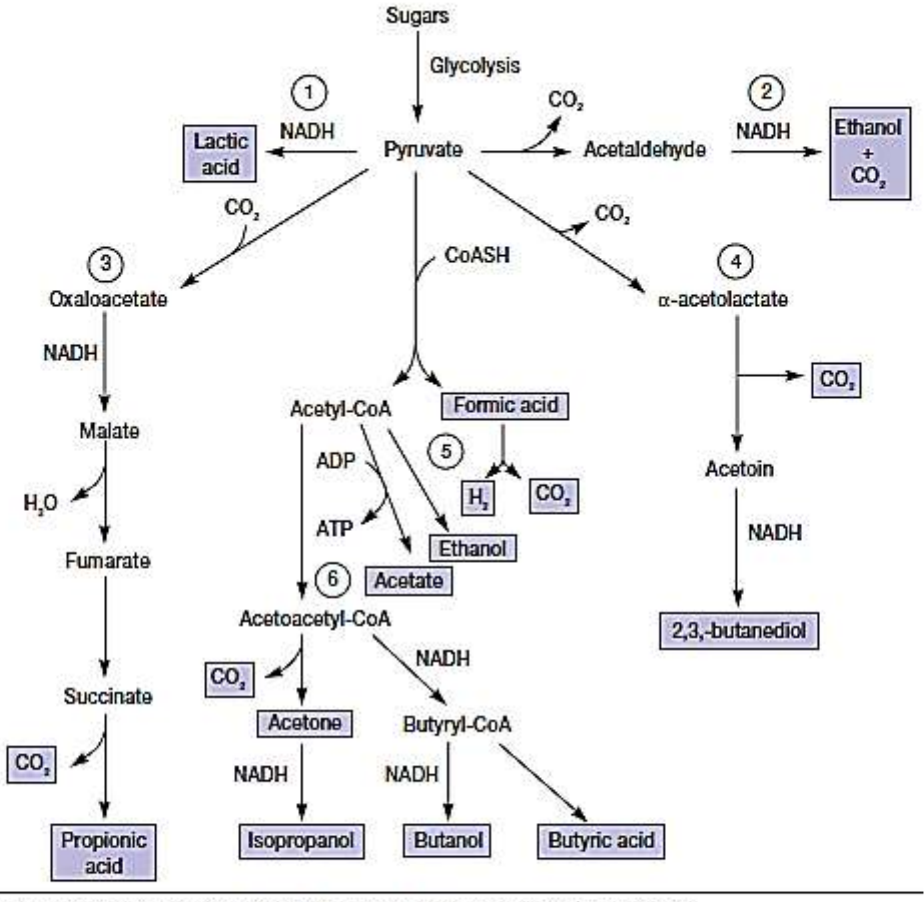
اختبار وسط التخمر Fermentation Media

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل وسط التخمر لتمييز الكائنات الحية على أساس قدرتها على تخمر الكاربوهيدرات في الوسط الزرعي.اذ يستعمل Andrade's formula للتمييز بين البكتيريا المعوية Enteric من Coryneforms وتستعمل صبغة البروموكريسول الأرجواني Bromocresol purple لتمييز المكورات المعوية Enterococci من المكورات العقدية Streptococci.

مبدأ الاختبار Principle

تستعمل الكائنات الحية الدقيقة عملية تخمير الكربوهيدرات لإنتاج الطاقة.معظم الكائنات الحية الدقيقة تحول الكلوكوز إلى البيروفيت أثناء التحلل السكري، ومع ذلك فأن بعض الكائنات الحية تعتمد مسارات ايضية بديلة. يتكون وسط التخمير من وسط أساسي يحتوي على واحد من الكربوهيدرات (الكلوكوز أو اللاكتوز أو السكروز)فضلا عن احتوائه على كواشف لونية مختلفة مثل Andrade اوBromocresol او غيرها للكشف عن إنتاج الحامض من التخمر، واحتواء الاختبار على أنبوب درهم Durham tube في كل الانابيب للكشف عن انتاج الغازخلال عملية التمثيل الغذائي.



الشكل (٢٠) المسارات الايضية للتخمر(Harley and Prescott.2002).

الوسط الغذائي الاساسي Basal media

اذابة (١٠غم) من الكازيين المهضوم Pancreatic digest of casein، و(٣غم) خلاصة لحم البقر Beef extract، و(٥غم) كلوريد الصوديوم NaCl،و(١٠غم) وكاربوهيدرات ، و(١٠مل) كاشف نوعي(Andrade's indicator) ذو اس هيدروجيني (٧,٤) او(٠,٠٢غم) بروموكريسول البنفسجي Bromocresol purple ذو اس هيدروجيني (٦,٨) في كمية من الماء

المقطر ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ويوزع في انابيب (٥ مل لكل انبوب)ويعقم بجهاز الموصدة بدرجة ١٢١ م وبضغط ١٥ باوند /انج ٢ ولمدة 15 دقيقة.

A/ وسط البيتون مع كاشف اندريد Peptone Medium with Andrade's Indicator (للبكتيريا المعوية Enterics والوتدية Coryneforms)

١- يلقح كل انبوب بقطرة واحدة من مزرعة بعمر (١٨-٢٤ ساعة) النامية في وسط نقيع القلب والدماغ السائل (brothBrain-heart infusion).

٢- تحضن في ظروف هوائية بدرجة (٣٥-٣٧) م°لمدة (٧أيام).

ملاحظة: تحضن الانابيب لمدة ٤ ايام بالنسبة لبكتيريا العائلة المعوية.

٣- اختبار الانابيب للكشف عن انتاج الحامض (يستدل عنه بتكون اللون الوردي) وانتاج الغاز.

٤- يجب ملاحظة ظهور النمو في الأنابيب. وعدم ظهور النمو في انابيب التخمر او انابيب السيطرة بعد (٢٤ساعة) من الحضن ، يضاف (١-٢) قطرة من مصل الارنب المعقم لكل انبوبة

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : يتغيرلون الوسط الى اللون الوردي بتكون او عدم تكون غازفي انبوب درهم. الشكل(٢١-A) الانبوب في الجانب الايسر.

* النتيجة السالبة: نمو، بدون تغيير لون الوسط . الشكل(٢١-A) الانبوب في الجانب الايمن.

B/ وسط نقيع القلب والدماغ السائل الذي يمكن استبداله مع صبغة الارجواني بروموكريسول البنفسجية (للمكورات العقدية والمكورات المعوية)

١- يلقح كل أنبوب مع (٢ قطرة) من مزرعة بعمر (١٨-٢٤ ساعة) النامية في وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Brain-heart infusion broth).

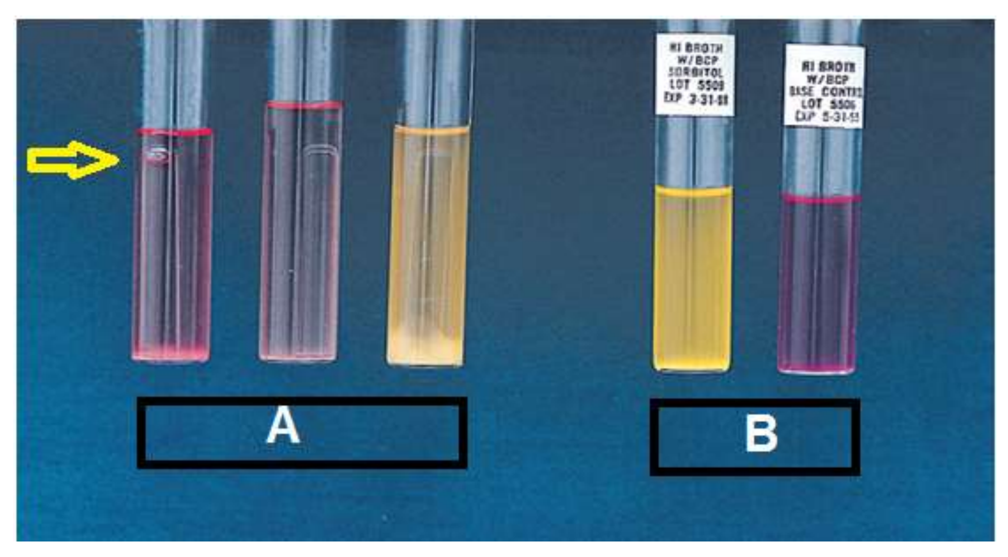
٢- تحضن بظروف هوائية بدرجة (٣٥-٣٧) م°لمدة (4أيام).

٣- يلاحظ التغيير اللوني لصبغة بروموكريسول الأرجواني إلى اللون الأصفر (الحامض).

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة :تغير لون الوسط الى الاصفر.الشكل(٢١-B) الانبوب في الجانب الايسر.

* النتيجة السالبة: نمو، وعدم تغير لون الوسط الزرعي الارجواني. الشكل(٢١ - B) الانبوب في الجانب الايمن.



الشكل (٢١) وسط التخمر، A:وسط الببتون مع كاشف Andrade . الانبوب في جانب اليسار تخمرالكلوكوز مع انتاج غازالمؤشرة بالسهم داخل انبوب درهم ، الانبوب في الوسط تخمر الكلوكوز بدون انتاج الغاز، والانبوب في الجانب الايمن لايوجد تخمر للكلوكوز.B: وسط نقيع القلب والدماغ السائل مع كاشف بروموكريسول الارجواني. الانبوب في الجانب الايسر موجب، والانبوب في الجانب الايمن سالب.

C-سط التخمر Phenol Red Broth

تحضير الوسط MediaPR (Carbohydrate) Broth

أذابة (١٠ غم) الكازائين المهضوم Pancreatic digest of casein، (٥ غم) كلوريد الصوديوم Sodium chloride ، (٥ غم) كاربوهيدرات (كلوكوز – لاكتوز – سكروز) (glucose، lactose، sucrose)، (٠,٠١٨ غم) احمر الفينول Phenol red ، في كمية من الماء المقطر ثم ويعدل الاس الهيدروجيني الى(٧,٥ – ٧,١) و يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{2} لمدة ١٥ دقيقة

اختبار التخمرالسكر بطريقة الاقراص Sugar-Differentiation Disk

الفترة الاولى First Period :

١- تحضر انابيب من وسط Tryptic agar baseوتؤشر حسب السكر المراد اختباره
٢- يعقم ملقط (بغمره بالكحول ٧٠% ومن ثم يعرض على لهب ويبرد)، يسحب كل قرص سكر ويضاف الى كل انبوبة معلمة
٣- يلقح كل انبوب عدا انبوب السيطرة وذلك ،باخذ كمية من البكتيريا بوساطة الناقل المعدني المستقيم ومن ثم يطعن الاكار بعمق يصل من ٢/١ الى ٣/١ الاكار ، ويجب دفع قرص السكر في الاكار شبه الصلب .اما انبوب السيطرة يجب ان يطعن بالناقل المعدني المعقم بدون تلقيح.
٤- تحضن الانابيب بدرجة ٣٥ م° لمدة (٢٤ ساعة) .

الفترة الثانية Second Period :

١- اختبار الانابيب بعد مرور (٢ – ٤ – ٨ – ١٨) ساعة.
٢- انتاج الحامض يظهر بلون اصفر حول لقرص الذي ينتشر في الوسط الزرعي. انتاج الغاز يظهر على هيئة فقاعات وتشقق الاكار شبه الصلب . ان النتائج الموجبة لتكوين الحامض سوف تلاحظ من خلال تتغير اللون بزيادة مدة الحضن، ولذلك فأن تلون الاكار باللون الاصفر في (٢ – ٤) ساعة حضن يعد نتيجة موجبة حتى وان تغير لون الوسط الاحمر الى البنفسجي بزيادة مدة الحضن.

اختبارتصبغ الاسواطFlagella Stain (Wet Mount Technique)

الغرض من الاختبار Purpose

تعتمد هذه التقنية لاختبار وجود وترتيب الاسواط لتشخيص انواع البكتيريا المتحركة

مبدأ الاختبار Principle

تكون الأسواط رقيقة جدا اذا لا يمكن رؤيتها باستعمال ألمجهر الضوئي والصبغات المألوفة مثل صبغة كرام او الصبغات البسيطة الاخرى .لذا تستخدم تقنية Wet Mount Technique لصبغ الاسواط البكتيرية وتكون بسيطة ،ومفيدة عندما يكون عدد وترتيب الاسواط مهم في تشخيص الانواع البكتيرية المتحركة. تتطلب طريقة التصبيغ باستعمال مادة مثبتة تساعد على التصاق الصبغة في طبقات الاسواط وبذلك تكون مرئية تحت المجهر.

طريقة العمل Method

١- تنمى البكتيريا المراد تصبيغها على وسط اكار الدم بدرجة حرارة الغرفة لمدة (١٦-٢٤ ساعة).
٢- اضافة قطرتين صغيرتين من الماء على الشريحة الزجاجية.
٣- يغمر ناقل معدني Loop بماء معقم.
٤- توضع حلقة الناقل المعدني المملوءة بالماء على حافة المستعمرة لمدة معينة (حتى يسمح للخلايا البكتيرية المتحركة من السباحة الى داخل القطيرة المائية).
٥- وضع حلقة الناقل المعدني المملوءة بالخلايا البكتيرية المتحركة على قطرة الماء على الشريحة الزجاجية. (تحريك حلقة الناقل المعدني بشدة داخل قطيرة الماء على الشريحة الزجاجية يؤدي الى قطع الاسواط عن الخلايا البكتيرية) .
٦- تغطى القطرة بغطاء شريحة (cover slip) برفق(كمية السائل على الشريحة الزجاجية يجب ان تكون كافية حسب مساحة غطاء الشريحة مع وجود مساحة فارغة حول حافة الغطاء)
٧- اختبار الشريحة بالمجهر الضوئي تحت قوة تكبير(٤٠ X) للخلايا المتحركة ، في حالة عدم مشاهدة الخلايا المتحركة يجب عدم اضافة الصبغة.
٨- عند مشاهدة الخلايا المتحركة ،تترك الشريحة بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٥-١٠ دقائق) حتى يسمح للبكتيريا بالالتصاق على زجاج الشريحة او على غطاء الشريحة .
٩- توضع قطرتان من صبغة Remel, Lenexa, Kansas (PYU) على حافة غطاء الشريحة اذ ستتدفق الصبغة بفعل الخاصية الشعرية وتمزج مع العالق البكتيري، (يعد الفراغ حول حافة غطاء الشريحة مفيدة لمساعدة العمل الشعري).

١٠-اختبار الشريحة بعد (٥-١٠ دقائق) بدرجة حرارة الغرفة .

١١-اختبار الخلايا ذات الاسواط تحت العدسة الزيتية ١٠٠X في المنطقة المثلى التي تتركز فيها الصبغة وهي في منتصف المسافة بين حافة الغطاء و مركز الشريحة.

١٢-توضع عدسة المجهر على الخلايا المرتبطة بالغطاء ثم على الخلايا المرتبطة على الشريحة لتسهيل رؤية الاسواط.لان ترسيب الصبغة على الشريحة اكثر من ترسيبها على الغطاء.

النتائج المتوقعة Expected Results

اختبار الشريحة كالاتي :

١- وجود او غياب الاسواط.

٢- عدد الاسواط لكل خلية .

٣- موقع السوط لكل خلية:

A – محيطية الاسواط Peritrichous. الشكل (٢٢- A)

B- طرفية السوط Lophotrichous. الشكل (٢٢- B)

C- قطبية السوط Polar.

٤- سعة موجة السوط Amplitude of wavelength.

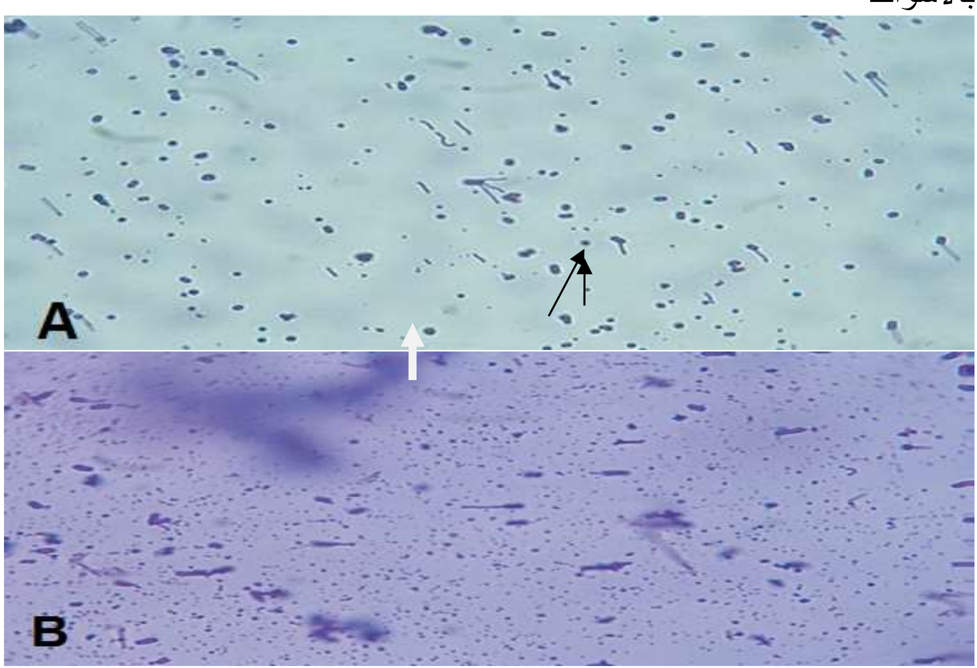
a- قصير Short.

b- طويل Long.

٥- اذا كانت مخصلة او لا.

الملاحظات :

تحتاج التقنية خبرة في اختبار الاسواط بالرغم من وجود الصبغة النوعية الخاصة بالاسواط



الشكل (٢٢) تقنية تصبيغ الاسواط .(Wet mount technique)

A: *Alcaligenes* spp.، peritrichous flagella

B: Pseudomonas aeruginosa، polar flagella

اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin Hydrolysis

الغرض من الاختبار Purpose

انتاج انزيم Gelatinase الذي له القدرة على تحلل الجلاتين ويستعمل كأختبار تخميني للتعرف على انواع من البكتيريا بضمنها .*Staphylococcus* sp، Enterobacteriaceae ، وبعض العصويات الموجبة لصبغة كرام.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار في تحديد قابلية البكتيريا على انتاج انزيمات هاضمة للبروتين الخارج خلوية extracellular proteolytic enzymes

الجيلاتينيز(gelatinases) التي تعمل على اسالة الجيلاتين الذي يعد من مكونات النسيج الضام للفقريات. الوسط الجيلاتين الغذائي يختلف عن الاوساط الغذائية المستعملة في علم الاحياء المجهرية الحاوية على مادة التصلب الاكار وذلك باحتوائه على الجيلاتين ، اذ ان انتاج البكتيريا للجيلاتنيزيعمل على اسالة (يميع) وسط النمو.

الوسط الزرعي Media

اذابة (٥غم) جيلاتين محلل انزيميا Enzymatic digest of gelatin ، (٣غم) خلاصة اللحم البقري Beef extract، (١٢٠غم) جيلاتين gelatin، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى 6.8ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ثم تعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج[٢] لمدة ١٥ دقيقة ثم توزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- تلقح انابيب الجيلاتين بـ (٤-٥ قطرات) من مزرعة سائلة بعمر (٢٤ ساعة)، اويلقح وسط الجلاتين من مزرعة بعمر ٢٤ ساعة بواسطة الطعن stabbing من (٤-٥ مرات) بعمق (٠,٥ انج) .
٢- تحضن الانابيب بدرجة (٣٥-٣٧) م° بظروف هوائية لمدة تصل الى (١٤ يوم).
٣- توضع انابيب الجيلاتين بعد الحضن في درجة (٤) م° لاختبار التميع، مع عدم قلب الانبوب اوعكسها لان في بعض الاحيان يكون التميع واضح فقط في اعلى منطقة التلقيح.

٤- تبرد انابيب الجيلاتين غير الملقحة بالبكتيريا (انابيب السيطرة) مع انابيب الملقحة، التميع يحدد فقط بعد تصلب الجيلاتين في انابيب السيطرة.

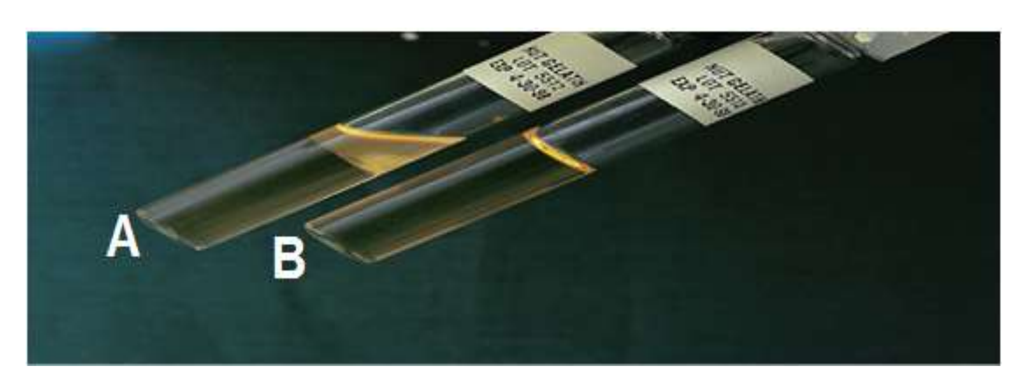
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : التميع الجزئي او الكلي (انابيب السيطرة يجب ان يكون متصلب كليا) في درجة (٤)م°لمدة ١٤ يوم. الشكل (23- A).

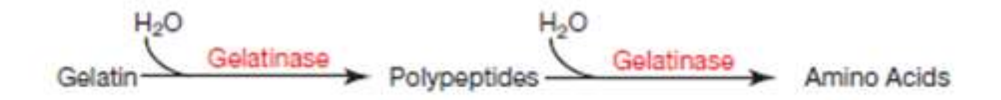
* النتيجة السالبة : التصلب الكلي للوسط في درجة (٤)م°. الشكل (٢٣- B).

الملاحظات :

١- بعض انواع البكتيريا قد تكون ضعيفة النمو او لا تنمو نهائيا في هذا الوسط.
٢- الجيلاتين سائل بدرجة حرارة فوق (٢٠)م°، لذلك يجب ان تكون النتائج بعد التبريد.
٣- يحضن الوسط بدرجة ٢٥ م للبكتريا التي تفضل النمو في هذه الدرجة بدلا عن درجة (٣٥)م°.



الشكل(٢٣) تحلل الجيلاتين Gelatin Hydrolysis: A : موجبة اعلى الوسط غير متصلب.B: سالب: انبوب غير ملقح.



الشكل (٢٤)تحلل الجيلاتين بوساطة بكتريا منتجة لانزيمGelatinase

اختبار النمو بدرجة ٤٢ م˚ Growth at 42°C

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذ الاختبار لتمييز البكتريا الزائفة المكونة للبايوسيانين*pyocyanogenic pseudomonads* من انواع الزائفة الاخرى .*Pseudomonas* sp. .

مبدأ الاختبار Principle

يحدد هذا الاختبار قابلية البكتيريا على النمو بدرجة ٤٢ م˚ ، انواع عديدة من بكتيريا الزائفة قد عزلت من المختبرات الطبية التي لها القدرة على النمو في درجات حرارة عالية.

طريقة العمل Method

١- يلقح انبوبان حاويان وسط(Trypticase soy agar (TSAبلمس خفيف لمستعمرة بعمر (١٣-٢٤ ساعة) بوساطة ناقل معدني loopوتخطيط السطح المائل للوسط.

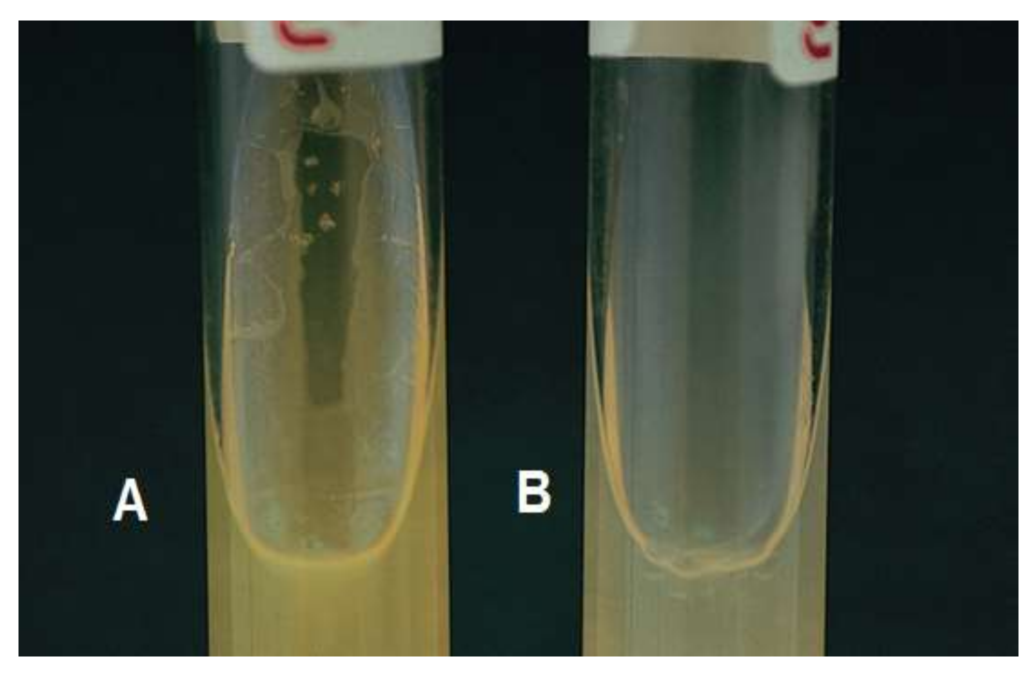
٢- يحضن بالوقت نفسه احد الانابيب بدرجة (٣٥) م˚ والاخر بدرجة (٤٢) م˚ .

٣- يسجل وجود نمو على السطح المائل بعد (١٨- ٢٤) ساعة في كلا الانبوبين.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : نمو جيد بدرجة ٣٥م˚ و ٤٢م˚.الشكل(٢٥-A).

* النتيجة السالبة : عدم وجود نمو في درجة ٤٢م˚، مع وجود نمو جيد عند درجة ٣٥م˚ . الشكل(٢٥- B).



الشكل(٢٥) النمو بدرجة ٤٢م°. A:موجب ، نمو جيد.B: سالب ، لايوجد نمو.

اختبارتحلل الهايبوريتHippurate Hydrolysis

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتحري عن انتاج انزيم Hippuricaseلتشخيص انواع عديدة من البكتيريا.

مبدأ الاختبار Principle

يتحلل حامض الهيبوركhippuric acidمائيا بواسطة انزيم hippuricase لينتج الكلايسين glycine وحامض البنزويك benzoic acid ، ثم تزال مجموعة الامين من حامض الكلايسين بوساطة عامل الاكسدة نانهايدرين (ninhydrinoxidizing agent) فيختزل والناتج النهائي من تفاعل اكسدة النناهايدرين يكون ارجواني اللون ،ويجب ان يحتوي وسط الاختبار hippurate فقط لان النناهيدرين ربما يتفاعل مع اي من الاحماض الامينية الحرة الموجودة في وسط النمو او الاوساط الزرعية الاخرى.

طريقة العمل Method

١- يضاف (٠,١ مل) ماء مقطر معقم الى انبوب بلاستكية ذات ابعاد ١٢x٧٥ملم.

٢- يحضر عالق بكتيري ذو نمو كثيف من البكتيريا المراد اختبارها.
٣- يوضع قرص Hippurateفي العالق البكتيري بوساطة ملقط معقم بالحرارة .
٤- تغطى الانبوب وتحضن لمدة (٢) ساعة بدرجة ٣٥م°ويفضل استعمال حمام مائي للحضن.
٥- يضاف (٠,٢ مل) كاشف نانهيدرين ninhydrin reagent واعادة حضنها لمدة (١٥- ٣٠) دقيقة .يلاحظ تغيرلون المحلول الى الارجواني الغامق.

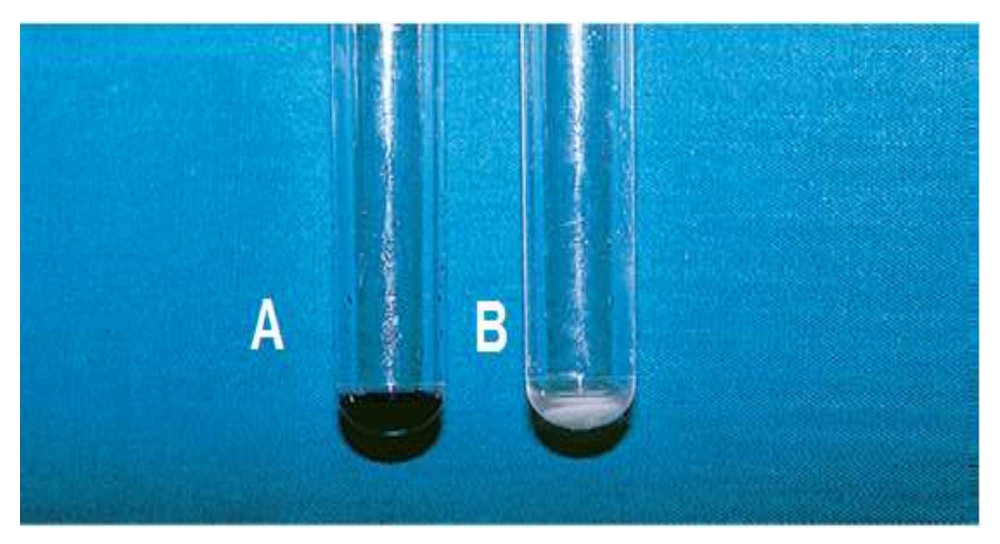
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : لون ارجواني غامق. الشكل (٢٦-A).

* النتيجة السالبة : عدم وجود لون او وردي فاتح مصفر(slightly yellow pink). الشكل (٢٦-B).

الملاحظات :

تكون نتيجة موجبة خاطئة عند الحضن مع نانهيدرين بمدة تتجاوز (٣٠) دقيقة.



الشكل (٢٦) اختبارHippurate Hydrolysis: A : نتيجة موجبة Positive .
B: نتيجة سالبة Negative.

اختبار الاندول Indole Production

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لمعرفة البكتيريا التي تنتج انزيم tryptophanase.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة البكتيريا على تحليل التربتوفان Tryptophan مائيا لتكوين مركب الاندولIndole. يتواجد التربتوفان Tryptophan في الكازائين Casein والبروتين الحيواني، وتحلل البكتريا التربتوفان مائيا بأنزيم Tryptophanase الى البايروفيت Pyruvate ،الامونيا Ammonia والاندول Indole، وعند اضافة كاشف كوفاكس Kovac's reagent (Dimethylamine-benzaldehyde hydrochloride)الى المزرعة السائلة فأنه يتفاعل مع الاندول منتجا بذلك لونا احمر. هناك طريقة بديلة تستخدم فيها كاشف أهرليك Ehrlich's reagent الذي يتكون من نفس المواد الكيميائية لكاشف الكوفاكس لكنه يحتوي على كحول الاثيل المطلق الذي يجعله قابلا للاشتعال. ويمتاز كاشف أهرليك Ehrlich's reagent بحساسيته للكميات القليلة من الاندوال.

الوسط الزرعي Media

اذابة (١٠غم) من ببتون الكازائينCasein peptone ، (٥غم) كلوريد الصوديوم NaCl و (١٠غم) تربتوفانTryptophan، في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ووزع في انابيب ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة . ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

A/ العائلة المعوية Enterobacteriaceae

١- يلقح وسط Tryptophane brothبقطرة واحدة من مزرعة بكتيرية نامية في وسط نقيع القلب والدماغ السائل (brain-heart infusion broth) بعمر (٢٤ ساعة) .
٢- تحضن الانابيب بدرجة (٣٥-٣٧) م° بظروف هوائية لمدة تصل الى (٤٨ ساعة).
٣- يضاف (٠,٥ مل) من كاشف كوفاكس للمزرعة السائلة.

B/ العصويات السالبة لصبغة كرام الاخرى Other Gram-Negative Bacilli

١- يلقح وسط Tryptophane broth بقطرة واحدة من مزرعة بكتيرية سائلة بعمر (٢٤ ساعة).
٢- حضن بدرجة (٣٥-٣٧) م°بظروف هوائية لمدة تصل الى (٤٨ ساعة).
٣- يضاف (١مل) من الزايلينxylene الى المزرعة.
٤- يحرك الخليط بقوة لاستخلاص الاندول ويترك لحين تكون الزايلين طبقة في اعلى المحلول المائي .
٥- يضاف (٠,٥ مل) من كاشف اهرليكEhrlich's reagentمن الجانب السفلي من الانبوب.

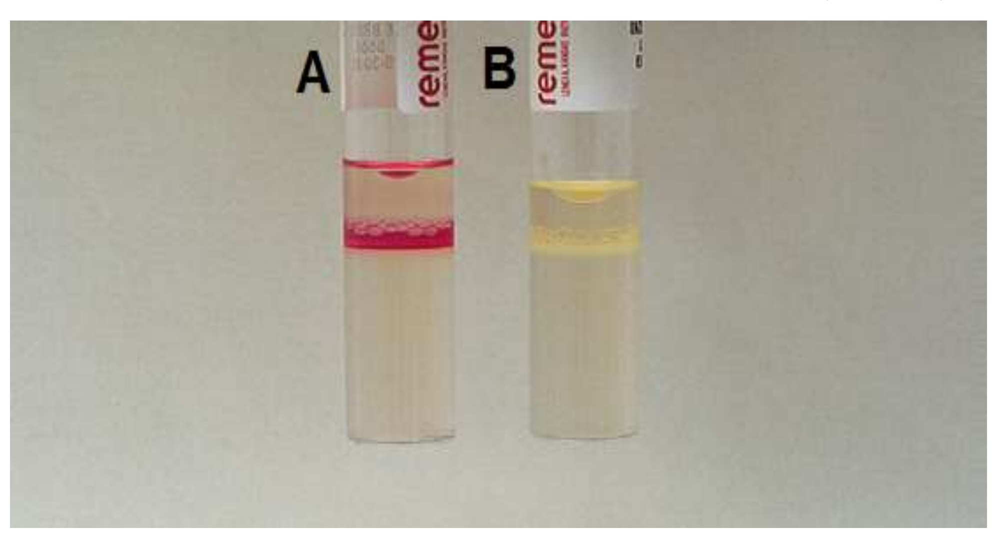
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : ظهور حلقة وردية الى لون الخمري بعد اضافة الكاشف المناسب.الشكل(٢٧-A).

* النتيجة السالبة:عدم تغير لون الحلقة بعد اضافة الكاشف المناسب. الشكل(٢٧-B).

الملاحظات :

تستعمل طريقة اهرليكEhrlich's method كذلك للتفريق بين البكتيريا تحت الظروف الغير هوائية.



الشكل (٢٧) اختبار انتاج الاندول Indole Production

A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبة Negative.

اختبار LeucineAminopeptidase (LAP) Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص المكورات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام السالبة لاختبار الكاتليز-catalase .

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل قرص (LAP) كاختبار سريع للكشف عن الانزيم LeucineAminopeptidase. تعد اقراص Leucine -beta- naphthylamide المادة الأساس للكشف عن الانزيم وبعد تحللها بواسطة الانزيم،تنتج مادة بيتا – نافثيل امين Beta-naphthylamine ذات اللون الاحمر عند اضافة كاشف Cinnamaldehyde.

طريقة العمل Method

١- ، يرطب قرص LeucineAminopeptidase قليلا بالكاشف المائي reagent-grade water مع عدم جعل القرص يتشرب بالشكل كبير بالكاشف قبل الحضن
٢- يستعمل قضيب خشبي رفيع لمزج كمية قليلة من عدة مستعمرات نامية في وسط زرعي بعمر (١٨-٢٤ ساعة) على مساحة صغيرة من قرص (LAP)
٣- تحضن الاقراص بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٥دقائق).
٤- بعد انتهاء فترة الحضن ،يضاف قطرة من كاشف Cinnamaldehyde.

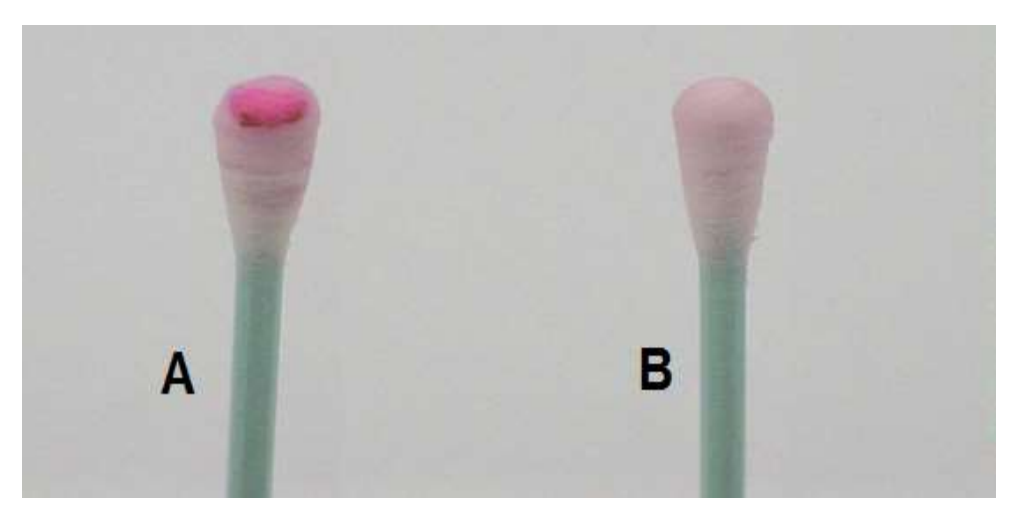
النتائج المتوقعة Expected Results

*النتيجة الموجبة : ظهور اللون الاحمر خلال (١دقيقة) بعد اضافة كاشفCinnamaldehyde.الشكل(٢٨-A).

* النتيجة السلبية: عدم تغير اللون او تغير الى الاصفر الخفيف .الشكل (٢٨-B) .

الملاحظات:

نتائج الاختبار تعتمد على صلاحية المادة المشبعة بالقرص.



الشكل(٢٨):اختبار LeucineAminopeptidase (LAP):

A:نتيجة موجبةPositive، B: نتيجة سالبةNegative.

اختباروسط (حليب اللتموس) Litmus Milk Medium

الغرض من الاختبار Purpose

يعتمد هذا الاختبار على التفريق بين انواع البكتيريا من خلال تفاعلاتها الايضية في حليب اللتموس litmus milk والتي تتضمن: التخمر، الاختزال، تكوين الخثرة، الهضم، وانتاج الغاز، وكذلك يستعمل وسط حليب اللتموس لنمو بكتيريا حامض اللبنيكlactic acid .

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة البكتيريا على ايض حليب اللتموس. ان تخمر اللاكتوز يظهر بوضوح عندما يتحول لون دليل اللتموس الى الوردي كنتيجة لأنتاج الحامض ،واذا كانت كمية الحامض المنتج كافية فأن الكازائين casein الحليب سوف يتخثر ويتصلب الحليب.يلاحظ مع بعض انواع البكتيريا انكماش خثرة الحليب وتكون مصل الحليب whey على سطح الوسط،و بعض البكتيريا تحلل الكازائين casein مائيا مسببة تغير لون الحليب الى التبني وعكارة المصل.فضلا عن بعض البكتيريا التي تختزل اللتموس litmus فيصبح الوسط في قعر الانبوب عديم الون.

الوسط الزرعي Media

اذابة (١٠٠غم) من مسحوق حليب الفرز skim milk و(٠,٥غم) لتموس litmus و(٠,٥غم) كبريتيد الصوديوم Sodium sulphite، ، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة . ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- يلقح الوسط بـ (٤ قطرات) من مزرعة سائلة بعمر (٢٤ ساعة).
٢- يحضن بدرجة (٣٥-٣٧) م° بظروف هوائية لمدة ٧ ايام .
٣- يلاحظ يوميا التفاعل القاعدي (تغير اللتموس للون الازرق)، التفاعل الحامضي (تغير اللتموس للون الوردي)، اختزال الدليل اللوني، التخثر الحامضي ، والببتنة peptonization . تغيرات متعددة تحدث خلال فترة الحضن.
٤- تسجل جميع الملاحظات.

النتائج المتوقعة Expected Results

جدول (١)مظهر الدليل اللوني(Appearance of Indicator (Litmus Dye)

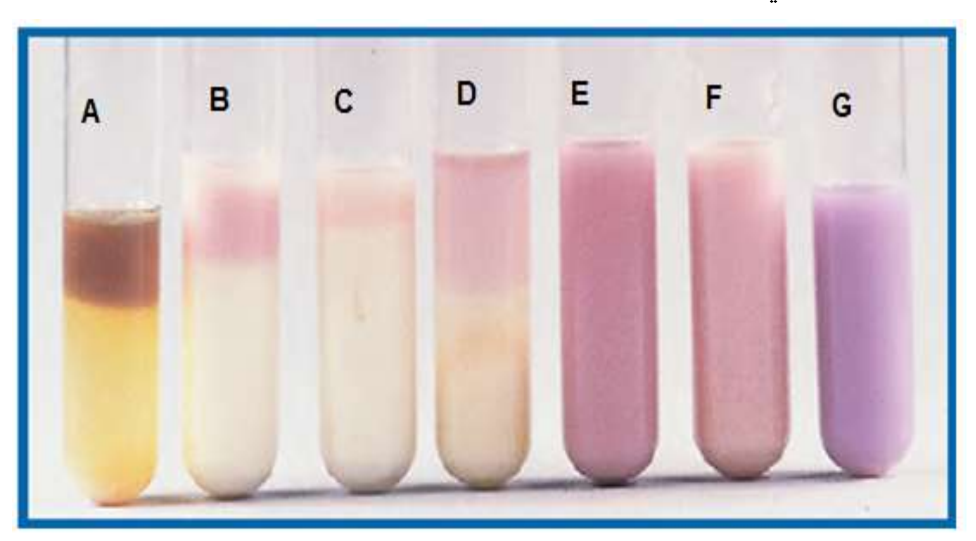
اللون	الاس الهيدروجيني PH	النتيجة
الوردي ، البنفسجي(الشكل ٣٠-A)	حامضي	حامضي(A)
الازرق (الشكل ٣٠-B)	قاعدي	قاعدي(B)
ارجواني مماثل للانبوب غير الملقح(السيطرة) (الشكل ٣٠-C)	عدم تغير اللون	عدم تغير اللون
ابيض (الشكل ٣٠-D)	اختزال الدليل اللوني دون الاعتماد على الاس الهيدروجيني	ازال اللون

جدول (٢)مظهر الحليب Appearance of Milk

قوام الحليب	الاس الهيدروجينيPH	النتيجة
تخثر او تكتل(الشكل ٣٠-E)	حامضي او قاعدي	تجلط
تحلل الخثرة بالشكل واضح ،تكون لون رصاصي سائل مائي ،انكماش ، خثرة وردية غير قابلة للذوبان(الشكل ٣٠-F)	حامضي	هضم
تحلل الخثرة بلون رصاصي ،سائل مائي ،انكماش، خثرة زرقاء غير قابلة للذوبان.	قاعدي	Peptonizationببتنة

الملاحظات :

* تفاعلات وسط اللتموس غير نوعية ولذلك يجب اجراءأختبارات اضافية للتشخيص النهائي للبكتيريا.



الشكل (٣٠) :نتائج وسط حليب اللتموس A:Litmus Milk هضم مع تفاعل قاعدي، B: تكون خثرة حامضية مع اختزال اللتموسC: تكون خثرة حامضية مع اختزال اللتموس وتكون غاز من التخمر D: تكون Curd واختزال اللتموسG: تفاعل قاعدي E: سيطرة غير ملقحة F: تفاعل حامضي

جدول (٣)نتائج اختبار حليب اللتموسLitmus Milk

Result	Interpretation	Symbol
Pink color	Acid reaction	A
Pink and solid (white in the lower portion if the litmus is reduced); clot not movable	Acid clot	AC
Fissures in clot	Gas	G
Clot broken apart	Stormy fermentation	S
White color (lower portion of medium)	Reduction of litmus	R
Semisolid and not pink; clear to gray fluid at top	Curd	C
Clarification of medium; loss of "body"	Digestion	D
Blue medium or blue band at top	Alkaline reaction	K
No change	None of the above reactions	NC

*These results may appear together in a variety of combinations.

اختبار Lysine Iron Agar (LIA)

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين العصيات السالبة لصبغة كرام استنادا الى عملية نزع الكربوكسيلDecarboxylation او نزع الامين Deamination من اللايسين و تكوين كبريتيد الهيدروجين(hydrogen sulfide(H2S .

مبدأ الاختبار Principle

يحتوي وسط اكار اللايسين والحديد على اللايسين lysine،ببتون Peptones ، وكمية قليلة من الكلوكوز ، وسترات الامونيوم الحديدية Ferric ammonium citrate ، ثايوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulfate، يتكون الوسط من سطح مائل هوائي وقعر لا هوائي .عندما يتخمر الكلوكوزفأن قعر الوسط يصبح حامضيا (اصفر)، اذ تنتج البكتيريا انزيم lysine decarboxylase يتكون cadaverine الذي يعادل الاحماض العضوية الناتجة من تخمر الكلوكوز ويتحول قعر الانبوب الى الحالة القاعدية (ارجواني). اما عدم انتاج انزيم decarboxylase فأن قعر الانبوب يبقى حامضي (اصفر).اما حدوث ازالة الامين التأكسدية للايسين فأن المركب الذي يتكون بوجود سترات الامونيوم الحديدية Ferric ammonium citrate ومساعد الانزيم Flavin mononucleotide يكون خمري (برغندي) اللون على السطح المائل . في حين عدم حدوث عمليةازالة الامين Deamination فأن السطح المائل للوسط يبقى ارجوانيا . ان بروموكريزول الارجواني Bromocresol purple تعد

كدليل على الاس الهيدروجيني اذ يكون اصفر اللون في اس هيدروجيني ٥,٢ او اقل و يكون ارجوانيا في اسى 6.8 او اعلى.

الوسط الزرعي Media

اذابة(٥غم) من جيلاتين مهضوم انزيميا Enzymatic digest of gelatin ، (٣غم) خلاصة الخميرة yeast extract، (١غم) دكستروز Dextrose، (١٠غم) L-lysine ، (٠,٥غم سترات الامونيوم الحديدية Ferric ammonium citrate و(٠,٠٤ غم) ثايوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulfate و(٠,٠٢ غم) بروموكريزول الارجواني Bromocresol purple، و (١٣,٥غم) اكار agar، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٧ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^2 لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم).

طريقة العمل Method

١- يلقح الوسط الزرعي اكار اللايسين والحديد بالطعن مرتين بناقل معدني مستقيم needle في قعر ومركز الانبوب ومن ثم يخطط السطح الوسط المائل. (الشكل ٣١- E) .
٢- يغطى الانبوب بأحكام ويحض بدرجة (٣٥ – ٣٧) م° في ظروف هوائية لمدة (١٨ – ٢٤) ساعة.

النتائج المتوقعة Expected Results

* سطح الوسط المائل قاعدي/ قعر قاعدي (K/K) :حدوث lysine decarboxylation وعدم تخمر الكلوكوز.الشكل(٣١ – A) .

* سطح الوسط المائل قاعدي / قعر حامضي (K/A) – تخمر الكلوكوز. الشكل(٣١ – C).

* سطح الوسط المائل احمر/ قعر حامضي (R/A) – حدوث lysine deamination و تخمرالكلوكوز.

*في حالة وجود راسب اسود دليل على تكون H2S

الشكل(٣١ – D).

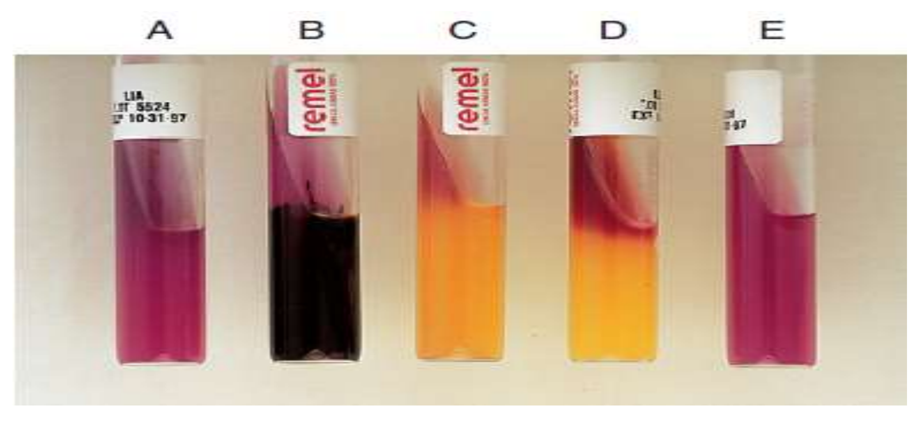
الجدول (٤)نتائج اختبار وسط Lysine Iron Agar (LIA)

Result	Interpretation	Symbol
Purple slant/purple butt	Lysine deaminase negative; Lysine decarboxylase positive	K/K
Purple slant/yellow butt	Lysine deaminase negative; Lysine decarboxylase negative; Glucose fermentation	K/A
Red slant/yellow butt	Lysine deaminase positive; Lysine decarboxylase negative; Glucose fermentation	R/A
Black precipitate	Sulfur reduction	H_2S

الملاحظات :

١- بكتيريا *Proteus* sp. التي تنتج كبريتيد الهيدروجينH2S لا يتكون اللون الاسود في الوسط،لذا يعمل اختبار اضافي اكار الحديد ثلاثي السكر triple sugar iron agar كطريقة تشخيصية متبعة.

٢- الشكل A وC ممكن ان يكون مصحوبا بتكوين راسب اسود من كبريتيد الحديد ferrous sulfide (FeS) ، الذي يشير الى انتاج كبريتيد الهيدروجين H2S. الشكل(٢٣ – B).



الشكل (٣١) اختبار Lysine iron agar

. A: سطح الوسط المائل قاعدي/ قعر قاعدي (K/K).B:سطح الوسط المائل قاعدي/ قعر قاعدي+تكوين كبريتيد الهيدروجين (K/K H2S+) :C: سطح الوسط المائل قاعدي / قعر حامضي (K/A).D: سطح الوسط المائل احمر/ قعر حامضي (R/A). E: انبوب غير ملقحة.

اختبار احمر المثيل / فوكاس بروسكاور-Methyl Red -Voges-Proskauer (MR-VP) Tests

الغرض من الاختبار Purpose

يعتمد الاختباران احمر المثيل methyl red (MR) وفوكاس بروسكاور(Voges-Proskauer (VP لتمييز انواع البكتيريا من اعضاء العائلة المعوية.

مبدأ الاختبار Principle

يعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة البكتيريا على انتاج وحفظ الحامض بالشكل مستقر من تخمر الكلوكوز للتغلب على سعة الدارئ للنظام فضلا عن تحديد قابلية بعض انواع البكتيريا لانتاج نواتج طبيعية نهائية مثل ٢،٣-بيوتانيديول (2،3-butanediol) او اسيتوين acetoin من تخمر الكلوكوز. يكشف احمر المثيل عن مزيج من الاحماض التي تقلل من الاس الهيدروجيني للوسط السائل ، ويعد احمر المثيل دليل لوني بعد مدة الحضن اذ يكون لونه احمر عند درجة اس هيدروجيني (٤،٤) واصفر عند درجة اس هيدروجيني (٦،٢)، واللون الاحمر الشفاف يعد نتيجة موجبة، والاصفر يعد نتيجة سالبة ،اما الطيف المتنوع من اللون البرتقالي يعد نتيجة سالبة او نتيجة غير حاسمة او غير قطعية . يكشف فوكاس بروسكاور عن قدرة البكتيريا على تحويل الحامض الناتج الى استيوين acetoin و ٢،٣-بيوتانيديول (2,3-butanediol).البكتيريا القادرة على استعمال مسار فوكاس بروسكاور ينتج عنه كمية قليلة من الاحماض خلال تخمر الكلوكوز ولذلك لا يحدث تغير في اللون عند اضافة دليل احمر المثيل ، اضافة كاشف ثانوي وهو الفا - نفثولalpha-naphthol ثم هيدروكسيد البوتاسيوم potassium hydroxide (KOH)، سوف يؤدي الى تكون لون احمر يدل على ايجابية اختبار فوكاس بروسكاور.

الوسط الزرعي Media

اذابة (٣,٥ غم) من نسيج حيواني مهضوم Peptic digest of animal tissue ، (٣,٥ غم) كازائين مهضوم pancreatic digest of casein، (٥ غم) دكستروز dextrose و (٥ غم) فوسفات البوتاسيوم KPO4، في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- يلقح وسط MR-VP بقطرة واحدة من مزرعة بكتيرية نامية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل (Brain-heart infusion broth) بعمر (٢٤ ساعة).
٢- تحضن الانابيب بدرجة (٣٥ – ٣٧) م° في حاضنة هوائية لمدة (٤٨) ساعة. لايمكن اجراء الاختبارات بمزرعة بكتيرية بعمر اقل من (٤٨ ساعة) ، وذلك لتراكم النواتج النهائية إلى المستويات المطلوبة .في حالة النتائج كانت غير واضحة بعد (٤٨ ساعة) تعاد الاختبارات بحضن الانابيب بدرجة (٣٥ – ٣٧) م° في حاضنة هوائية لمدة (٤ - ٥) ايام ، مع حضن مكررات الانابيب في درجة حرارة (٢٥) م° .
٣- يقسم الوسط الزرعي الى انبوبتين بعد انتهاء الحضن لاجراء اختبار احمر المثيل MR و فوكاس بروسكاورVP.

A/ اختبار احمر المثيل :

١- يضاف (٥ – ٦) قطرات من كاشف احمر المثيل لكل (٥ مل) من المزرعة السائلة المحضونة.
٢- يقرأ التفاعل حالا.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة: لون احمر براق يدل على تكون مزيج من الاحماض . الشكل(32 –A).

* النتيجة الموجبة الضعيفة: لون احمر – برتقالي.

* النتيجة السالبة : لون اصفر. الشكل (32 – B) .

B/ اختبار فوكاس بروسكاورVP طريقة باريت (Barritt's Method) لبكتيريا العصوية السالبة لصبغة كرام :

١- يضاف (٠,٦ مل او ٦ قطرات) من محلول A (alpha-naphthol) و (٠,٢ مل او ٢ قطرة) من محلول B (KOH) الى (١ مل) من الوسط الزرعي MR-VP السائل .
٢- يرج جيدا بعد اضافة كل كاشف.
٣- يلاحظ لمدة (٥ دقائق) .

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : لون احمر ، يشيرالى انتاج الاستوينacetoin الشكل(32 – C) .

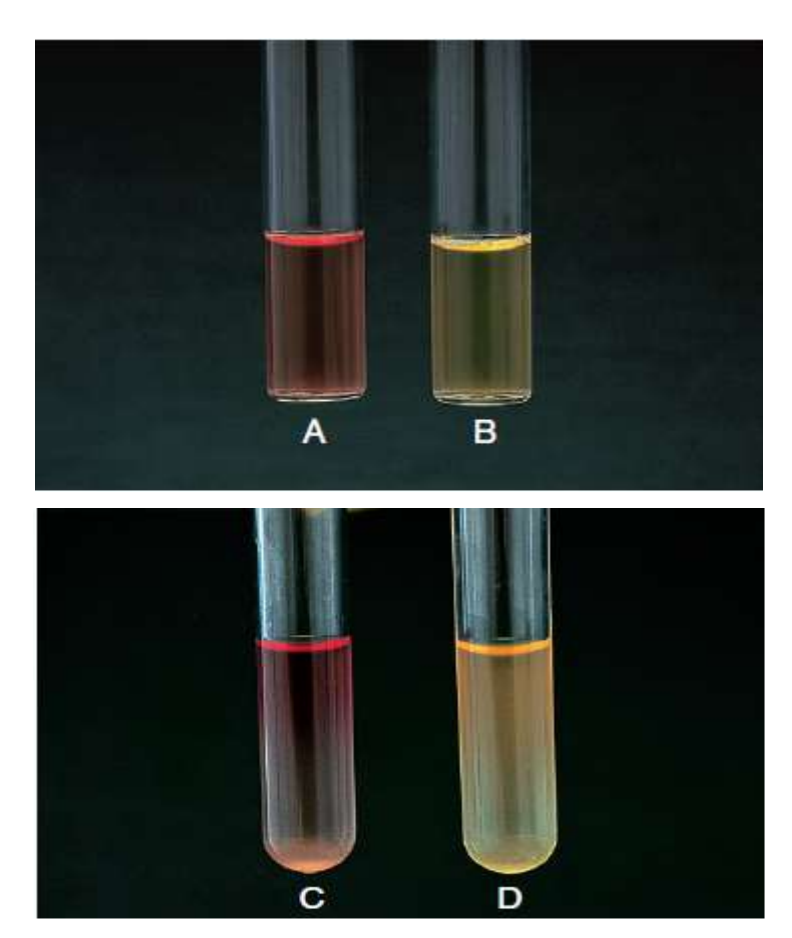
* النتيجة السالبة : لون اصفر الشكل(D – 32) .

C / اختبار فوكاس بروسكاورVP طريقة كوبلنتز (Coblentz Method) لبكتيريا المكورات العقدية Streptococci .

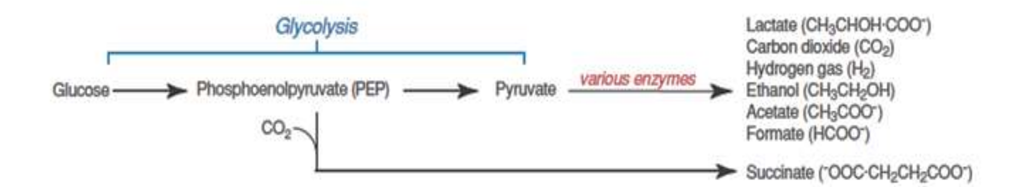
١- يلقح (٢ مل) من وسط MR-VP بكتريا نامية في اطباق اكار الدم بعمر (٢٤ ساعة) بوساطة ناقل معدني Loop.
٢- تحضن الانابيب لمدة (٦ ساعات) وبدرجة (٣٥)مْ في حاضنة هوائية، ثم يضاف (١,٢ مل او١٢ قطرة) من محلول (alpha-naphthol) A و (٠,٤مل او ٤قطرات) من محلول B(40%KOH مع creatine).
٣- يرج الانبوب جيدا ويحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة (٣٠ دقيقة).

الملاحظات :

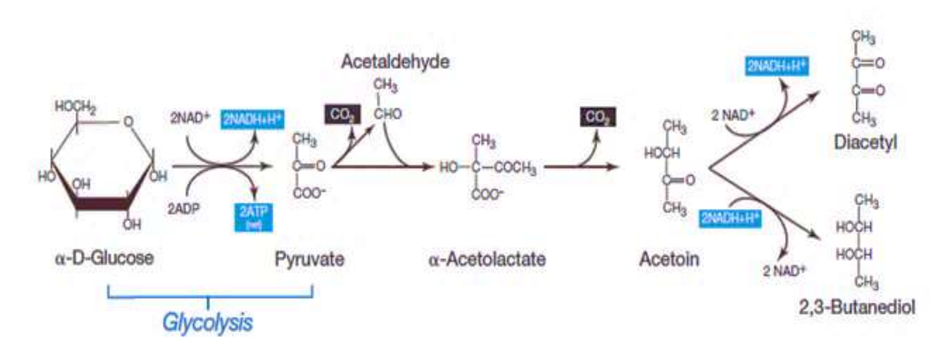
١- يجب الا يقرأ اختبار MR قبل (٤٨ ساعة) ، لان بعض انواع البكتيريا لاتنتج كمية كافية من نواتج تخمر الكلوكوز.
٢- تظهر البكتيريا السالبة لاختبار MR نتيجة موجبة وذلك لعدم وجود وقت كاف لتحويل تلك النواتج .
٣- اختبار MR-VP يجب ان يقترن باختبارات تأكيدية للتفريق بين بكتيريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae.



الشكل (٣٢) : اختبار احمر المثيل –فوكاس بروسكاورMR-VP . A:احمرالمثيل موجب. B:احمرالمثيل سالب .C:فوكاس بروسكاور موجب. D:فوكاس بروسكاور سالب.



الشكل (٣٣)انتاج مزيج من الاحماض خلال تخمر الكلوكوز لاعطاء نتيجة موجبة لاختبار احمر المثيل ،اغلب حامض formate يتحول الى H2 و CO2 اما Succinet يتكون خلال مسار PEP وليس Puruvite ويكون بين Formate وAcetate



الشكل (٣٤)تخمر Butanediolاذ يتم اختزال acetoin بوساطة NADHوينتج 2,3- Butanediol.اكسدة acetoinالى diacetylالذي يعد دليل على اختبار VP

الشكل (٣٥) اختبار الفوكاس بروسكاور باستعمال كواشف الفا –نفثول وكاشف هيدروكسيد البوتاسيوم اذ يتم تفاعل الكواشف مع Acetoin وتتاكسد الى diacetyl الذي يتفاعل مع guanidine (الناتج من الببتون في الوسط الغذائي) ليعطي اللون الاحمر

اختبارمكروديز(الاوكسديز المحور) Microdase Test (Modified Oxidase)

الغرض من الاختبار Purpose

يعمل هذا الاختبار للتمييز بين بكتيريا المكورات الموجبة لصبغة كرام الموجبة لاختبار الكاتليز(المكورات الدقيقة micrococci من المكورات العنقودية staphylococci).

مبدأ الاختبار Principle

يعد اختبار انزيم microdase طريقة سريعة للتمييز بين بكتيريا المكورات الدقيقة *Micrococcus* spp. من المكورات العنقودية *Staphylococcus*. بوساطة الكشف عن انزيم الاوكسديز oxidase . ، بوجود الاوكسجين يتفاعل

انزيم الاوكسيديز (oxidase) مع كاشف الاوكسيديز oxidase reagent والسايتوكروم C(cytochrome C) لتكوين المركب الملون indophenols.

طريقة العمل Method

١- يلقح كمية قليلة من عدة مستعمرات من مزرعة بكتيرية نقية نامية على وسط اكار الدم بعمر (١٨-٢٤) ساعة باستعمال ناقل خشبي وتحرك على مساحة صغيرة من قرص المايكروديزmicrodase disk. مع ملاحظة عدم ترطيب القرص قبل الاستعمال .

٢- تحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٢ دقيقة) .

النتائج المتوقعة Expected Results

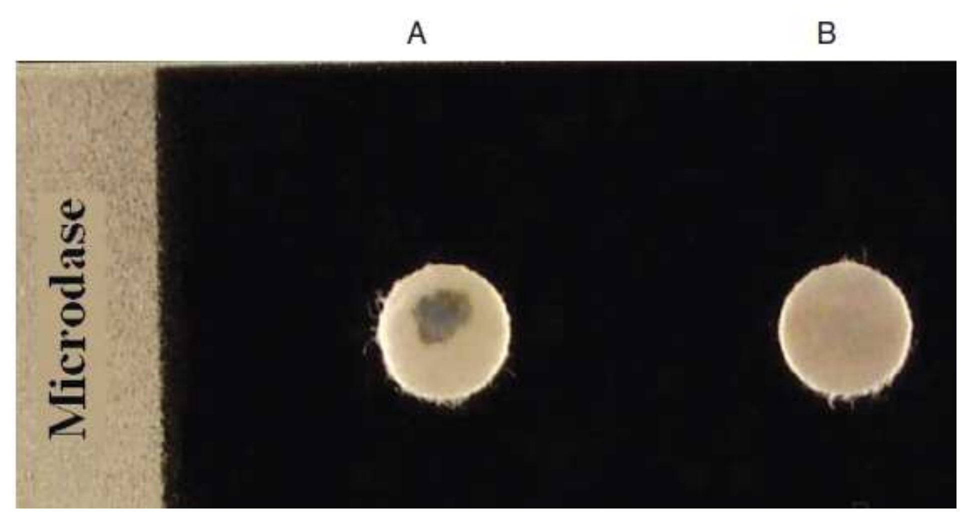
* النتيجة الموجبة: تغير اللون من الازرق الى الارجواني المزرق. الشكل (٣٦ – A).

* النتيجة السالبة : عدم تغير اللون . الشكل (٣٦ – B).

الملاحظات:

يجب ان تعطي المكورات العنقودية Staphylococci نتيجة سالبة عدا *S. sciuri*،*S. lentus*

و*S. vitulus*.



الشكل (٣٦) اختبار microdase. A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبةNegative.

اختبار الحركة Motility Testing

الغرض من الاختبار Purpose

يعمل هذا الاختبار لتحديد البكتيريا المعوية المتحركة،التي تمتلك اسواطا للحركة

مبدأ الاختبار Principle

يلقح وسط الاكار شبه الصلب بعمق بوساطة ناقل معدني مستقيم بطريقة الطعن. يكون الدليل على ان البكتيريا متحركة وذلك بانتشار منطقة النمو ممتدة خارج خط الطعن (التلقيح). بعض انواع البكتيريا يمتد نموها ليشمل كل وسط النمو في الانبوب ، بينما انواع الاخرى تظهر مناطق صغيرة او عقد نمو خارج خط الطعن(التلقيح).

الوسط الزرعي Media

اذابة (١٠ غم) من جلاتين المهضوم انزيميا Enzymatic digest of gelatin، (٣ غم) خلاصة اللحم البقري Beef extract، (٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl و (٤ غم) من الاكار ، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٣ ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة وتترك بالشكل افقي لحين التصلب . ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل افقي لحين تصلبها (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم).

طريقة العمل Method

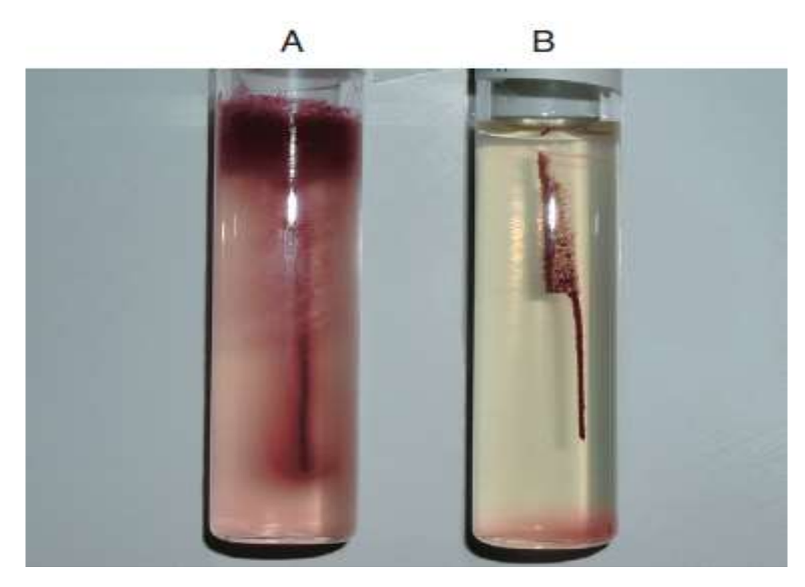
١- لمس مستعمرة بكتيرية فتية بعمر (١٨ – ٢٤) ساعة النامية على وسط الاكار بوساطة ناقل معدني مستقيم .
٢- طعن مرة واحدة وبعمق ٣/١ الى ٢/١ انج في مركز الوسط الزرعي في الانبوب .
٣- تحضن الانابيب بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م°، وتفحص يومياً لمدة ٧ ايام.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة: تنتشر حركة البكتيريا خارح حدود خط الطعن (التلقيح) . الشكل(٣٧ – A).
* النتيجة السالبة :تبقى البكتيريا غير المتحركة ضمن خط الطعن . الشكل(٣٧ – B).

الملاحظات :

بعض انواع البكتيريا لاتظهر نموا كافيا في هذا الوسط الزرعي ، فيجب ان يكون الاختبار متبوعا باختبارات اضافية.



الشكل(٣٧) : اختبار الحركة

A: النتيجة الموجبة Positive. B: النتيجة السالبة Negative.

اختبار الحركة Hydrogen Sulfide Production and Motility وكبريتيد الهيدروجين

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتميز بين البكتيريا التي لها القابلية على الحركة وتكوين كبريتيد الهيدروجين والاندوال،اذ يستعمل للتمييز مثلا بكتيريا *Proteus vulgaris* التي تكون متحركة ومكونة لـ H_2S وبكتيريا *Klebsiella pneumonia* التي تكون غير متحركة وغير مكونة لـ H_2S .

مبدأ الاختبار Principle

يوجد العديد من البروتينات التي تكون غنية بالاحماض الامينية التي تحتوي الكبريت مثل السيستين ، وعند تحلل تلك البروتينات مائيا بوساطة بعض انواع البكتيريا يتم تحرير الأحماض الأمينية، يفقد السيستين ذرة الكبريت بوجود انزيم cysteine desulfurase، و من خلال إضافة الهيدروجين الناتج من الماء

يكون غاز كبريتيد الهيدروجين،و كما يمكن إنتاج كبريتيد الهيدروجين الغازي عن طريق اختزال المركبات الحاوية على الكبريت غير العضوية مثل ثيوسلفات(S_2O3^{2-}) ، والكبريتات ($SO4^{2-}$)، او الكبريتيد ($SO3^{2-}$)، فان بعض البكتيريا تقوم بهضم ثيوسلفات الصوديوم sodium thiosulfate ثم اختزاله إلى كبريتات sulfite باستعمال إنزيم اختزال ثيوكبريتات thiosulfate reductase ، و تحرر غاز كبريتيد الهيدروجين. يحتوي وسط اكار SIM Agar الببتون و ثيوسلفات الصوديوم sodium thiosulfate كمادة اساس وكبريتات الامونيوم الحديدية ferrous ammonium sulfate Fe(NH4)SO4 كدليل على انتاج H2S والسستين يعد من مكونات الببتونات المستعملة في وسط SIM ، قلة نسبة الاكار في الوسط يجعله شبه صلب.بمجرد إنتاج H2S فإنه يتحد مع كبريتات الامونيوم الحديدية ويكون راسب أسود غير قابل للذوبان من كبريتيد الحديديك يمكن رؤيته حول منطقة التلقيح واذا كان الكائن الحي متحركًا أيضًا ، قد يتحول الأنبوب إلى اللون الأسود بالكامل.يدل اللون الأسود في الأنبوب الى نتيجة موجبة لـ H2S، وعدم وجود راسب أسود يدل الى سلبية النتيجة .يمكن أيضًا استعمال وسط SIM للكشف عن وجود أو غياب الحركة في البكتيريا فضلا عن إنتاج الإندول . امتداد النمو عن منطقة التلقيح يدل على حركة البكتيريا في الوسط الزرعي اذا تهاجر البكتيريا المتحركة من خط التلقيح لتشكيل عكارة كثيفة في الوسط المحيط بينما عدم امتداد النمو يشير الى عدم قابلية البكتريا على الحركة

Biochemistry within bacteria

(a)

$$H_2O + H_2N-\underset{COOH}{\overset{CH_2-SH}{C}}-H \xrightarrow[\text{desulfurase}]{\text{cysteine}} \underset{COOH}{\overset{CH_3}{C}}=O + NH_3 + H_2S$$

Cysteine — Pyruvic acid — Ammonia — Hydrogen sulfide gas

(b)

$$2S_2O_3^{2-} + 4H^+ \xrightarrow[\text{reductase}]{\text{thiosulfate}} 2SO_3^{2-} + 2H_2S$$

Thiosulfate — Sulfite — Hydrogen sulfide gas

الشكل (٣٨) انتاج كبريتيد الهيدروجين

اختبار وسط ام أر أس MRS Broth

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد البكتيريا القادرة على تكون غاز خلال تخمر سكر الكلوكوز. مثل بعض انواع بكتيريا *Lactobacillus* spp. و*Leuconostoc* sp. .

مبدأ الاختبار Principle

يحتوي وسط MRS السائل مصادر الكاربون ، النتروجين والفيتامينات التي تدعم نمو بكتيريا حامض اللاكتيك lactobacilli وبكتيريا اخرى . وهو وسط زرعي انتقائي لاحتوائه خلات الصوديوم sodium acetate وستريت الامونيوم ammonium citrate لتجنب نمو البكتيريا الملوثة ،اذ يعد النمو على الوسط نتيجة موجبة وقد يضاف انبوب درهام Durham tube للتمييزبكتيريا *Lactobacillus* spp. من بكتيريا *Leuconostoc* sp..

الوسط الزرعي Media

اذابة (١٠ غم) من انسجة حيوانية مهضومة انزيميا Enzymatic digest of animal tissue، (١٠ غم) خلاصة اللحم البقري beef extract ، (٥ غم) خلاصة الخميرة yeast extract ، (٢٠ غم) دكستروزdextrose، (٥ غم) خلات الصوديوم NaC2H3O2، (١ غم) بولي سوربيتpolysorbate 80، (٢غم) فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2Po_4 (٢غم) سترات الامونيوم ammonium citrate، (٠,١ غم) كبريتات الغنيسيومMgSO4، (٠,٠٥ غم) كبريتات المنغنيزMnSO4 ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٥ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، وتعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^2 لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب.(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

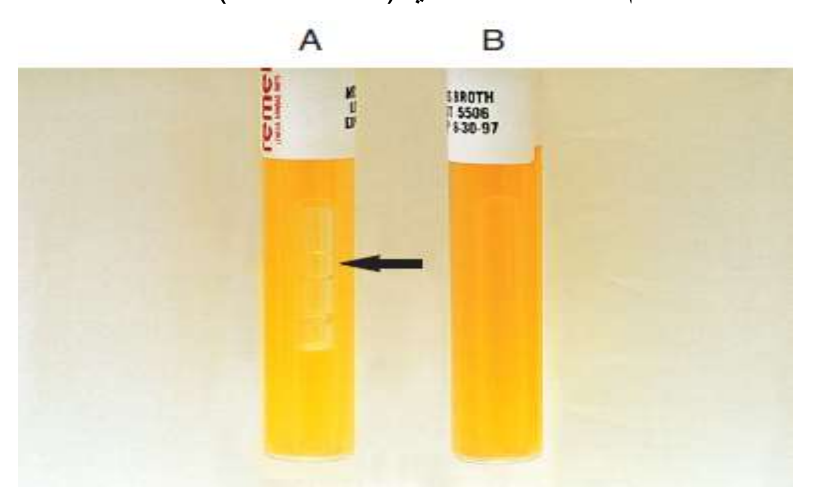
١- يلقح وسط MRS السائل من مزرعة بكتيرية صلبة او سائلة بعمر (١٨ -٢٤) ساعة.
٢- يحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° لمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة في حاضنة هوائية.

النتائج المتوقعة Expected Results

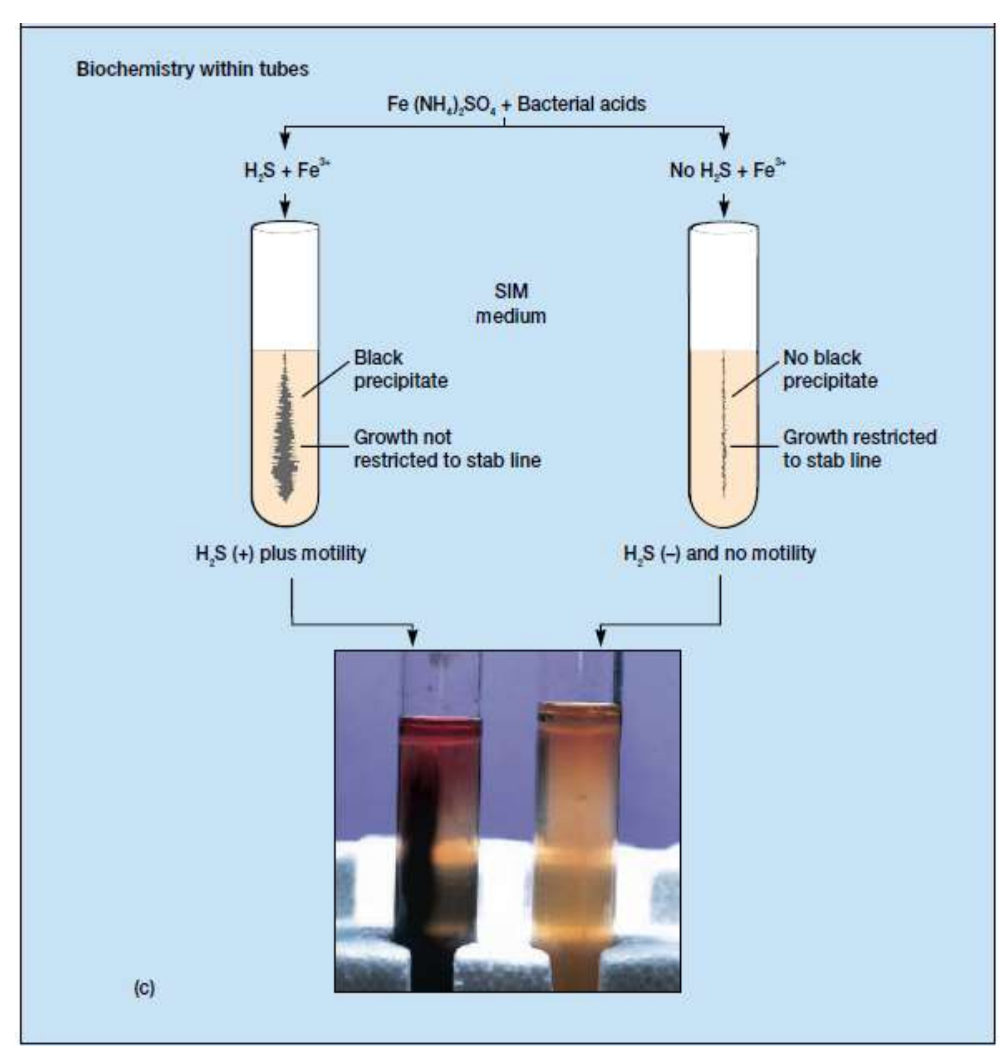
* النتيجة الموجبة : نمو بكتيريا *Leuconostoc*sp وانتاج غاز بدلالة تكوين فقاعة في انبوب درهام Durham tube. الشكل (٣٩– A).

* النتيجة الموجبة : نمو بكتيريا *Lactobacillus* spp. بدون انتاج غاز. الشكل (B – ٣٩).

* النتيجة السالبة : عدم وجود نمو بكتيري (لايشاهد نمو).



الشكل(39) : اختبار وسط MRS السائل .A: نتيجة موجبة انتاج الغاز بوساطة *Leuconostoc* sp. (السهم).B: نتيجة موجبة ، نمو بكتيري بدون تكوين غاز بوساطة *Lactobacillus* sp.



الشكل (٤٠)انتاج كبريتيد الهيدروجين وحركة البكتريا

اختبار 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronide (MUG) Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص اجناس متعددة من العائلة المعوية و بكتيريا القولون *Escherichia coli* المنتجة للفيروتوكسين verotoxin.

مبدأ الاختبار Principle

تنتج بكتيريا القولون والعائلة المعوية انزيم β-d-glucuronidase الذي يحلل مائيا مشتقات β-d-glucopyranosid-uronic الى aglycons و d-glucuronic acid. يتحلل القرص المشبع بالمادة الأساس 4-Methylumbelliferyl-β-d-glucuronide بوساطة الانزيم لينتج 4-methylumbelliferyl، الذي يشع بلون ازرق تحت الاشعة فوق البنفسجي ذات الطول الموجي العالي. مع ذلك فأن سلالات بكتيريا *E. coli* المنتجة للفيروتوكسين verotoxin لاتنتج (MUG) و النتيجة السالبة لهذا الاختبار تعد دليلا لوجود سلالة ذات اهمية سريرية .

طريقة العمل Method

١- يرطب القرص بقطرة واحدة من الماء.
٢- يفرك القرص بجزء من مستعمرة من مزرعة نقية بعمر (١٨ – ٢٤) باستعمال ناقل خشبي.
٣- يحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° في حافظة مغلقة لمدة (٢ ساعة).
٤- اختبار القرص باستعمال ضوء فوق بنفسجي بطول موجي (٣٦٦ نانومتر).

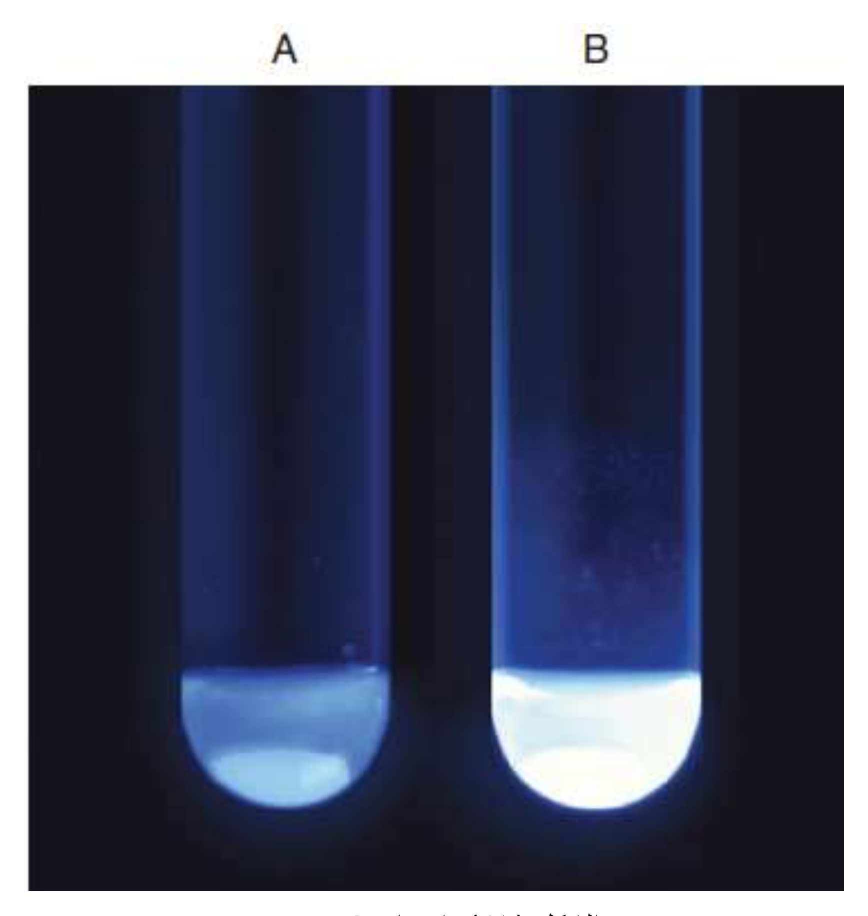
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : وميض كهربائي ازرق. الشكل(٤١ – A) .

* النتيجة السالبة : عدم وجود وميض . الشكل(٤١ – B).

الملاحظات :

١- عدم اختبار مستعمرات معزولة من اوساط حاوية اصباغا مثل(MacConkey،Eosin methylene blue) ، وذلك بسبب صعوبة تفسير النتائج .
٢- يجرى الاختبار فقط على البكتيريا الموجبة لاختبار الاوكسديزوذلك بسبب بعض البكتيريا السالبة لاختبار تكون مشعة طبيعيا .



الشكل (٤١): اختبار MUG .

A : النتيجة الموجبةPositive .

B: النتيجة السالبةNegative.

اختبار اختزال النترات Nitrate Reduction

الغرض من الاختبار Purpose

يجرى هذا الاختبار للتعرف على قدرة الخلايا البكتيرية لاختزال النترات الى نتريت. تمتازكل اعضاء العائلة المعوية Enterobacteriaceae بأختزال النترات، لكن بعض اعضائها تايض النتريت الى مركبات اخرى.

مبدأ الاختبار Principle

يتطلب التمثيل الغذائي اللاهوائي مستقبلا للالكترون غير الأكسجين الجوي (O2).العديد من البكتيريا السالبة لصبغة كرام تستخدم النترات كمستقبل نهائي للالكترون، والتي تنتج انزيم nitrate reductase الذي يحول النترات nitrate (NO_3) الى النتريت(NO_2)، ان اضافة sulfanilic acid وalpha-naphthylamine ، يؤدي الى تفاعل sulfanilic acid مع النتريت ليكون ملح diazonium salt ويزدوج الملح مع alpha-naphthylamine لانتاج صبغة azoحمراء قابلة للذوبان في الماء واذا لم يحدث تغير في اللون فأن البكتيريا لم تختزل النترات او تختزلها الى NH3 ، NO، $N2O_2$. وعند ذلك يضاف الزنك Zinc، اذ يختزل بقايا النترات الى النتريت والتفاعل سيتحول الى الموجب، وهذا دليلا على نتيجة الاختبار السالبة لعدم قابلية البكتريا على اختزال النترات، اذا لم يحدث تغير في اللون بعد اضافة الزنك، هذا يشير الى ان البكتيريا اختزلت النترات الى واحد من المركبات النتروجينية التي ذكرت. يوضع انبوب درهام Durham tube في الوسط الزرعي وذلك لسببين :

١- تكوين الغاز في انبوب درهم يعد دليلا على تلف الوسط قبل التلقيح
٢- لتحديد حدوث النترجة بوساطة البكتيريا التي تنتج الغاز بمسار بديل، فاذا تكون الغاز في الانبوب قبل اضافة الكاشف اللوني فان نتيجة الاختبار سالبة بالنسبة لاختزال النترات بهذه الطريقة.

الوسط Media

اذابة (٢٠ غم) من الجيلاتين المهضومPancreatic digest of gelatin ، (٢غم) نترات البوتاسيوم KNO3، في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ،ويوزع في انابيب مع انبوب درهام ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة...

طريقة العمل Method

١- يلقح وسط النترات السائل بـ (١-٢) قطرة من مزرعة بكتيرية سائلة فتية .الشكل(٤٢ – D) .

٢- يحضن لمدة (٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥ -٣٧) م° في ظروف هوائية . (بعض انواع البكتيريا تحتاج مدة حضن اطول للحصول على نمو كاف). اختبار ظهور نمو واضح في الانابيب بعد (٢٤) ساعة اولمدة اقصاها (٧) ايام.

٣- اختبار المزرعة السائلة بعد مدة حضن مناسبة لوجود الغاز، اختزال النترات ، واختزال النتريت من خلال الخطوات التالية:

A- ملاحظة وجود غاز في انبوب درهام، بدلالة الفقاعات داخل انبوب درهام .

B-يضاف (٥) قطرات لكل من محلول كاشف النترات A (sulfanilic acid) و B (alpha-naphthylamine) ، واختبار لمدة (٣) دقائق على الاقل لتغير اللون الى الاحمر .

C-عدم تغير اللون ، يجب ان اختبار باضافة مسحوق الزنك ، وذلك بغمس ناقل خشبي في مسحوق الزنك وتنقل الكمية التي التصقت بالناقل الخشبي الى وسط النترات السائل المضاف له محلول A و B ، و اختبار لمدة (٣) د قائق على الاقل لتغير اللون الى الاحمر، يكسر الناقل الخشبي في الانبوب بعد اضافة الزنك وذلك للدلالة على اضافة الزنك.

النتائج المتوقعة Expected Results

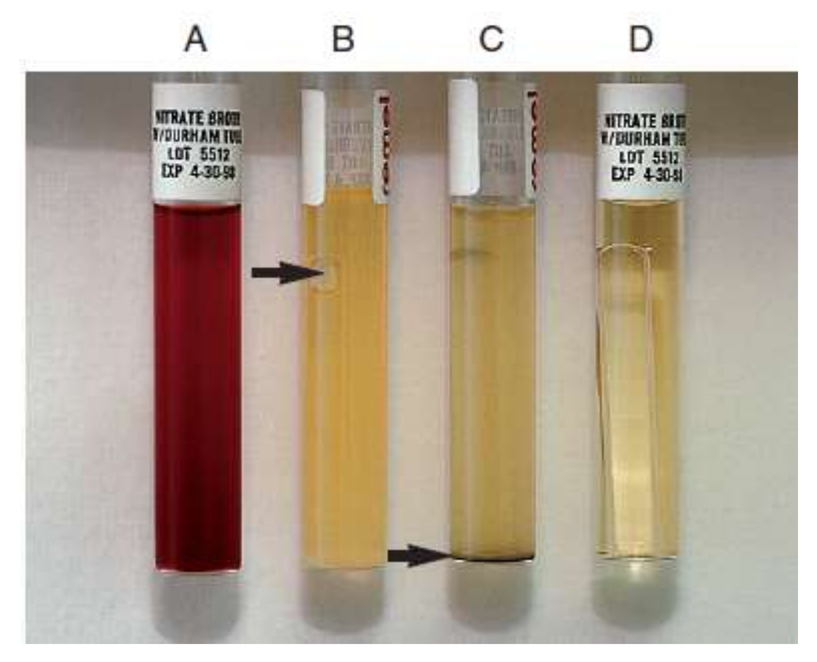
اختبار اختزال النترات يتضمن وجود او عدم وجود ثلاثة نواتج ايضية: غاز ، النترات (NO_3) و نتريت (NO_2). النتائج المتوقعة ممكن ايجازها كما ياتي :

جدول (٥) نتائج اختبار اختزال النترات

التفاعل	غاز	اللون بعد اضافة محلول A وB	اللون بعد اضافة الزنك	تفسير النتيجة
$NO_2 \Leftarrow NO_3$	غير مكون	احمر	_	+ NO3 بدون غاز
$NO_2 \Leftarrow NO_3$ Partial nongaseous end products	غير مكون	احمر	_	+ NO3 بدون غاز
$NO_2 \Leftarrow NO_3$ gaseous end products(الشكل٤٢- B)	مكون	احمر	_	+ NO3 +غاز
NO3 ⟸ Gaseous end product(الشكل٤٢- C)	مكون	غير مكون	غير مخمر	+ NO3، +NO2، غاز+C
NO3 ⟸ nongaseous end products	غير مكون	غير مكون	غير مكون	+ NO3، +NO2، بدون غاز
NO3 ⟸ بدون تفاعل	غير مكون	غير مكون	احمر	سالب

الملاحظات:

*اختبار اختزال النترات يعد اختبارا داعما لتشخيص العائلة البكتيرية المعوية Enterobacteriaceae الى مستوى الجنس ، ويتبع بأختبارت تأكيدية للتشخيص النهائي.



الشكل(٤٢): اختزال النتراتA. Nitrate Reduction: نتيجة موجبة بدون غاز.B: نتيجة موجبة مع غاز(السهم). C:نتيجة موجبة بدون لون بعد اضافة الزنك(السهم). D: انابيب غير ملقحة.

اختبار اختزال النتريت Nitrite Reduction

الغرض من الاختبار Purpose

يعمل هذا الاختبار لتحديد فيما اذا البكتيريا تختزل النتريت الى النتروجين الغازي او الى مركبات اخرى تحتوي النتروجين.

مبدأ الاختبار Principle

تستطيع البكتيريا من اختزال النتريت الى نتروجين مع انتاج غاز وعدم تغير اللون ولايضاف مسحوق الزنك.

تحضير الوسط Media

اذابة (٢ غم) من وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-heart infusion broth ، (١٠ غم) كازائين مهضوم انزيميا pancreatic digest of casein ، (٥ غم) نسيج حيواني مهضوم peptic digest of animal tissue ، (٣ غم) خلاصة الخميرة ، (٥غم) كلوريد الصوديوم NaCl، (٠,١غم) نتريت الصوديم$NaNO_2$ ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ،ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة .ثم وزع في انابيب.(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- يلقح وسط النتريت السائل بقطرة واحدة من مزرعة سائلة بعمر (٢٤) ساعة.
٢- يحضن لمدة (٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥ -٣٧) م°
٣- اختبار الوسط بعد (٤٨) ساعة لملاحظة غازالنتروجين في انبوب درهام المقلوب، ويضاف (٥) قطرات من كواشف النترات AوBللكشف عن وجود النتريت (كاشف AوB ذكرت في اختبار النترات).

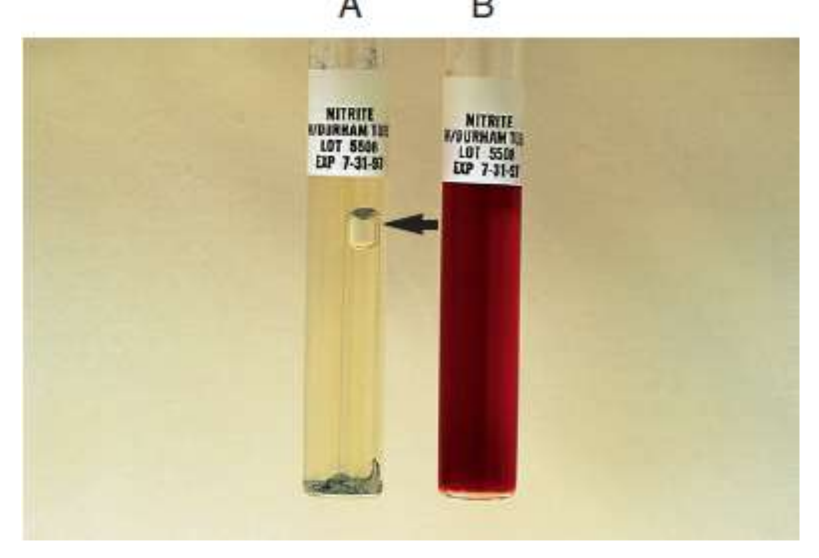
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : عدم تغير لون الوسط الزرعي الى الاحمر بعد (٢) دقيقة بعد اضافة الكواشف مع انتاج غاز في انبوبة درهام . الشكل (٤٣- A).

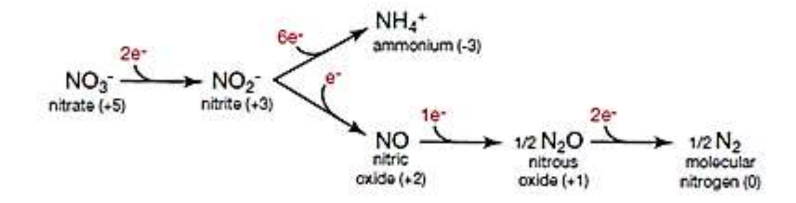
* النتيجة السالبة : تغير لون الوسط الزرعي الى الاحمر بعد اضافة الكواشف مع عدم انتاج غاز . الشكل (٤٣- B).

الملاحظات :

*عدم تكون اللون الاحمر وعدم انتاج غاز ، يضاف مسحوق الزنك لتحديد عدم تاكسد النتريت الى النترات (لذا يبطل الاختبار). اذا حدث التأكسد فالسائل سوف يتحول الى اللون الاحمر بعد اضافة الزنك.



الشكل (٤٣) : اختزال النتريتNitrite Reduction. A: النتيجة الموجبة ، عدم تغير اللون بعد اضافة الزنك وتكون غازفي انبوبة درهام (سهم).B: النتيجة سالبة.



الشكل (٤٤) اختزال النتريت :العديد من الاحياء المجهرية تختزل النتريت تحت ظروف مختلفة فالعائلة المعوية Enterbacteriaceaeتختزل النتريت الى نترات NO3والبكتريا الاخرى تختزله الى نتروجين N2بعملية تدعى Denitrifiersوكلاهما تحدث تحت ظروف تدعى التنفس اللاهوائي .اما الانواع الاخرى من الكائنات قادرة على تمثيل النتريت واختزاله الى الامونيا NH4الذي يدخل في تخليق الاحماض الامينية

الشكل (٤٥) دليل التفاعل

يختزل النتريت الى نترات وحامض النتروز (nitrous acid)والاخير يتفاعل مع sulfanilic acidليكون حامض diazotized sulfanilic الذي يتفاعل مع alpha naphthylamine ليكون p-sulfobenzene-alpha-naphthylamine ذات اللون الاحمر والذي يدل على ايجابية الاختبار

اختبار o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside (ONPG) Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار في تحديد البكتيريا التي تنتج انزيم β-galactosidase الذي يحلل المادة الاساس ONPG مائيا ليكون ناتج اصفر مرئي orthonitrophenol.يميز الاختبار البكتريا المخمرة اللاكتوز المتأخرة من غير المخمرة في العائلة المعوية Enterobacteriaceae .

مبدأ الاختبار Principle

البكتريا المخمرة للاكتوز تكون قادرة على نقل الكربوهيدرات بفعل (β-galactoside permease)والتحلل المائي بفعل(β-galactosidase) للاكتوز lactose الى الكلوكوز glucose وكالاكتوز galactose. البكتيريا الغير القادرة على انتاج β-galactosidase ربما تصبح متغايرة وراثيا ومحللة من خلال اليات متعددة وتشخص على انها مخمرة للاكتوز المتأخر. يدخل ONPG الى الخلايا البكتيرية التي لاتنتج انزيم permease لكنها قادرة على تحلل ONPG مائيا الى الكالاكتوز galactose ومركب اصفر o-nitrophenol، وهذا يعد دليلا لوجود β-galactosidase.

الوسط Media

(طريقة الانابيب)

اذابة (٩,٤٦ غم) من فوسفات هيدروجين الصوديوم احادية الهيدروجين Na2HPO4 ، (٤ غم) phenylalanine ، (٢ غم) ONPG، (٠,٩٠٧ غم) فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4 ، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل الاس الهيدروجيني الى ٨,٠ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة .ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

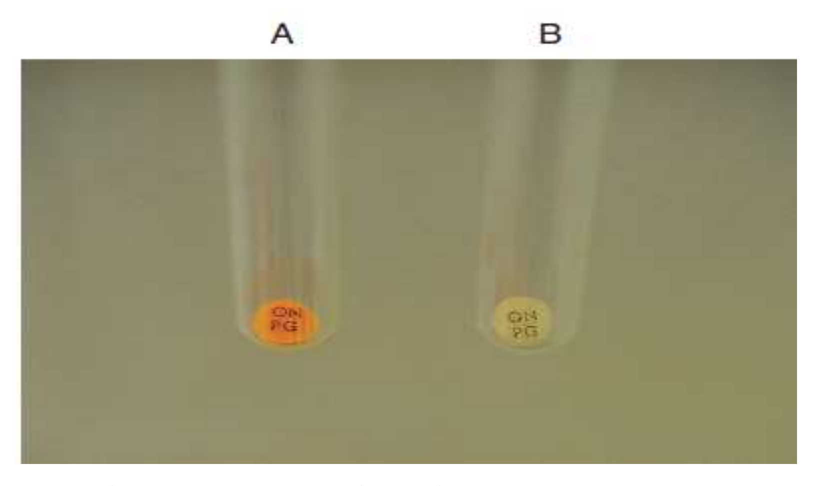
طريقة العمل Method

١- يلقح انبوب حاوية كلوريد الصوديوم بتركيز (٠,٨٥ %) بوساطة ناقل معدني Loop معقم مملوء ببكتيري
٢- يوضع قرص ONPG في الانبوب .
٣- يحضن لمدة (٤ ساعات) بدرجة حرارة (٣٧) م° في ظروف هوائية .
٤- اختبار تغير اللون في الانبوب.

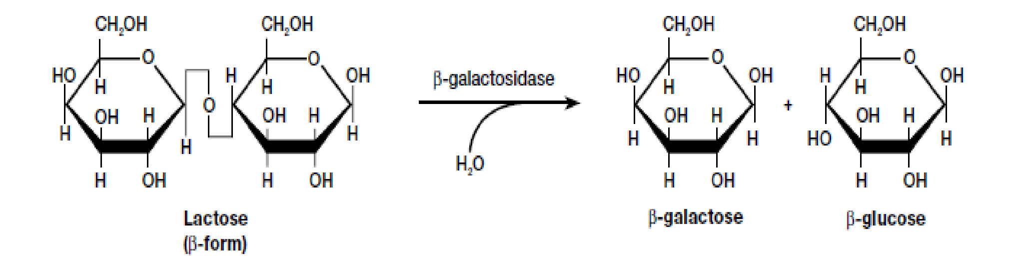
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : اصفر (وجود β-galactosidase) . الشكل (٤٦- A).

* النتيجة السالبة : بدون لون (عدم وجود β-galactosidase) . الشكل (٤٦- B).



الشكل (٤٦) : اختبار OPNG. A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبةNegative.



الشكل (٤٧) تحلل اللاكتوز بفعل انزيم beta galactosidase

اختبارحساسية Optochin (P disk) Susceptibility Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد تأثير Optochin (Ethyl hydrocupreine hydrochloride) على البكتيريا . يقوم Optochin بتحلل بكتيريا المكورات الرئوية pneumococci (موجبة للاختبار) ، في حين تكون مكورات الفا العقدية alpha-streptococc مقاومة (سالبة للاختبار).

مبدأ الاختبار Principle

يتداخل مضاد Optochin مع ATPase وينتج ادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) في البكتيريا. يوضع قرص (Optochin)المشبع (TaxoP) على طبقة من البكتيريا النامية على اطباق اكار الدم ، بالشكل يسمح للمضاد الحيوي بالانتشار خلال الوسط الزرعي. يثبط المضاد الحيوي نمو البكتيريا الحساسة مكونا بذلك منطقة تثبيط zoneشفافة حول القرص. يعد قطر المنطقة المثبطة من (١٤ - ١٦) ملم حساسة ، ويعداختبارOptochin تخميني لبكتيريا *Streptococcus pneumoniae*.

طريقة العمل Method

١- تلقح اطباق من اكار الدم الحاوي (٥ %) sheep blood باثنان الى ثلاث مستعمرات من مزرعة نقية ، باستعمال ناقل معدني Loop بطريقة التخطيط.

٢- يوضع قرص المضاد الحيوي Optochin في الثلث العلوي من المنطقة المخططة في الطبق،باستعمال ملقط معقم و يضغط برفق على القرص للتأكد من اتصال القرص مع سطح الوسط.

٣- يحضن الطبق لمدة (١٨ – ٢٤) ساعة بدرجة حرارة (٣٥) م° في ظروف (٥ %) منCo_2.

٤- تقاس منطقة التثبيط بالمليمترات مع قطرالقرص.

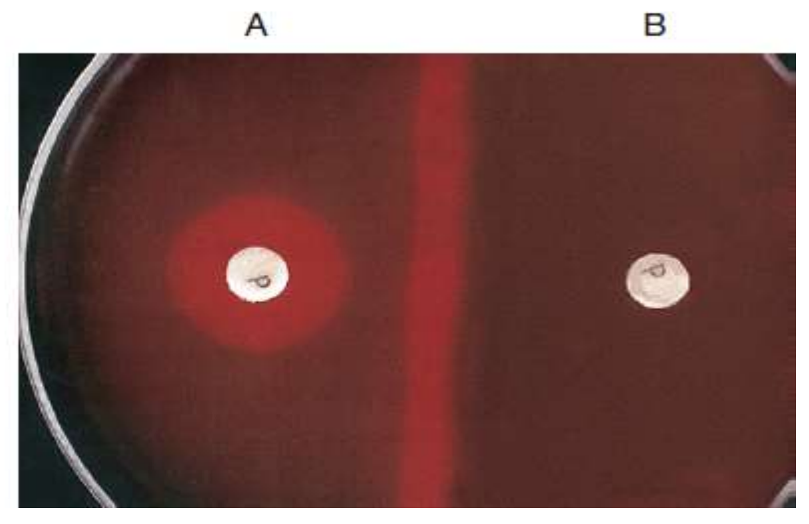
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : منطقة تثبيط بقطر(≤ ١٤ملم) لقرص بقطر (٦ ملم) الشكل (٤٨ – A) .

* النتيجة السالبة : عدم وجود منطقة تثبيط . الشكل (٤٨ – B).

الملاحظات :

١- النتيجة غير الدقيقة (المشكوك بها) اذا تكون منطقة التثبيط اقل من (١٤ ملم) للمكورات الرئوية، لذا يثبت تشخيص سلالة المكورات الرئوية بوساطة اختبار bile-solubility test الموجب النتيجة.
٢- عدم حضن الاطباق في حاضنة هوائية لتلافي حدوث مناطق تثبيط اوسع.



الشكل(٤٨) : اختبار قرص Optochin (TaxoP disk) .

A: بكتيريا *Streptococcus pneumoniae* يظهر منطقة تثبيط اكبر من (١٤ ملم) نتيجة موجبة .

B: نمو البكتيريا Alpha-hemolytic *Streptococcus* sp. حول القرص(نتيجة سالبة).

اختبار الاوكسيديز (طريقة كوفاكس) Oxidase Test (Kovac's Method)

الغرض من الاختبار Purpose

يحدد هذا الاختبار وجود فعالية انزيم سايتوكروم الاوكسديز cytochrome oxidase في البكتيريا لتشخيص بكتيريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae السالبة لاختبار الاوكسديز وتمييزهاعن العصويات الاخرى السالبة لصبغة كرام.

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل في تحديد وجود سايتوكروم الاوكسديز البكتيري cytochrome oxidase مستخدما اكسدة المادة الأساس tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride الى indophenols ، وانتاج لون ارجواني غامق كناتج نهائي. النتيجة الموجبة تعني (وجود الاوكسديزoxidase) يستدل به بوساطة تغير اللون الى الارجواني الغامق . عدم ظهور اللون يشير الى نتيجة سالبة للاختبار وغياب الانزيم.

طريقة العمل Method

١- ترطب ورقة الترشيح بمادة dihydrochloridephenylenediaminetetramethyl – P -) ١%) او استعمال اقراص ورقية متوفرة تجاريا مشبعة بالمادة الاساس .

٢- تنقل جزء صغير من المستعمرة البكتيرية (يفضل ان تكون بعمر ٢٤ ساعة) من سطح الاكار باستعمال ناقل معدني من البلاتين او خشبي وتمزج العينة على ورقة الترشيح او القرص التجاري.

٣- ملاحظة تغير اللون الى الازرق الغامق او الارجواني خلال (١٠ ثواني)في منطقة التلقيح على ورقة الترشيح او الاقراص الورقية.

النتائج المتوقعة Expected Results

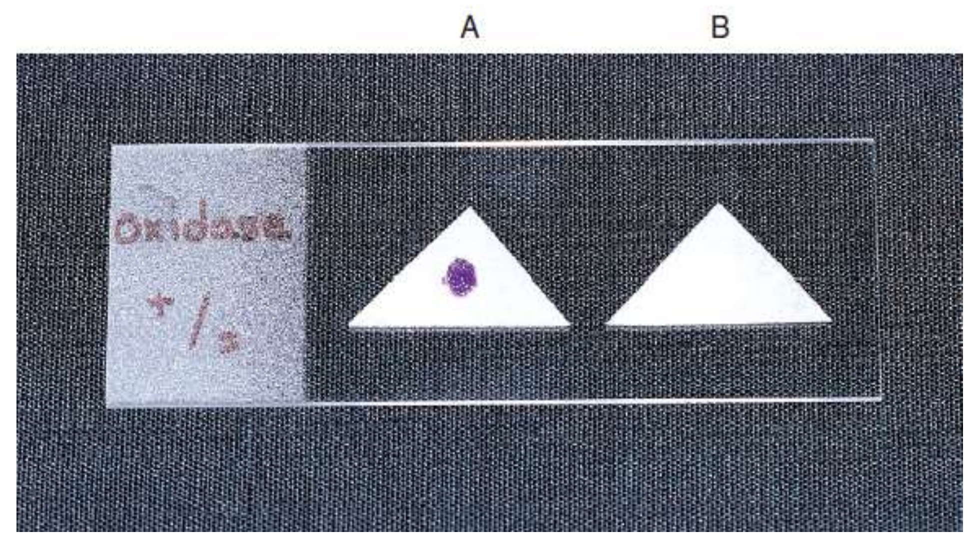
* النتيجة الموجبة : تغير اللون الى الارجواني الغامق خلال (١٠ ثواني) . الشكل (٤٩ – A).

* النتيجة السالبة : عدم ظهور لون . الشكل (٤٩ – B).

الملاحظات :

*التوقيت بالغ الاهمية في هذا الاختبار

*استعمال أسلاك من سبائك النيكل تحتوي الكروم والحديد (nichrome) لمزج او فرك والصاق المستعمرة البكتيرية على ورق الترشيح ربما تعطي نتيجة موجبة خاطئة .



الشكل (٤٩) : Oxidase Test (Kovac's Method).

A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبة Nagative .

Tetramethyl-*p*-phenylenediamine$_{red}$ (colorless) + 2 Cytochrome c_{ox} —(cytochrome c oxidase)→ Tetramethyl-*p*-phenylenediamine$_{ox}$ (deep purple/blue) + 2 Cytochrome c_{red}

الشكل (٥٠)اختزال مادة (Tetramethyl – P – phenylenediamine dihydrochloride) بفعل انزيم Oxidaseاذ تتم العملية بعد ازالة الكترون من السايتوكروم سي ليتفاعل فيما بعد مع الكاشف

اختبار الاكسدة والتخمر Oxidation/Fermentation (of) Medium (CDC Method)

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين البكتيريا على اساس قدرتها على التأكسد او التخمر لكربوهيدرات معينة .

مبدأ الاختبار Principle

يستعمل هذا الاختبار لتحديد فيما أذا كانت البكتيريا تستعمل الكربوهيدرات لانتاج الحامض كناتج عرضي . تختبر قدرة البكتيريا غير المخمرة على انتاج الحامض من ٦ انواع كاربوهيدرات (كلوكوزglucose ، زايلوزxylose، مانتول mannitol، لاكتوز lactose ، سكروز sucrose، ومالتوز maltose). تلقح٦ انابيب تحتوي كربوهيدرات فضلا عن انبوب سيطرة يحتوي وسط اساس (OF) بدون كربوهيدرات. كذلك يستعمل وسط الحديد الثلاثي السكر (TSI) Triple sugar iron agar (طريقة TSI) لتحديد البكتيريا التي تخمير الكلوكوز. يستعمل وسط الاكسدة / التخمر لتحديد قدرة البكتيريا على تخمر الكلوكوز الشكل (٥١ –A) او اكسدة الكلوكوز الشكل (٥١ –B). عدم حدوث تفاعل في (TSI) او OF، فأن البكتيريا تعد غير مستهلكة للكلوكوز الشكل (٥١ –C). وصفة هيو Hugh و ليفسون Leifson تستعمل نسبة واطئة من الببتون الى كمية محدودة من الكربوهيدرات،اختزال هذه النسبة المحددة من الببتون يكون الامينات القلوية التي تحجب انتاج الحامض الناتج من الاكسدة الايضية.

لتفسير اختبار (OF)يتطلب انبوبتين ملقحتين ، احدهما يغطى سطحه بالزيت المعدني، منتجة بيئة لاهوائية وحدوث تغير في اللون دليل على التخمر. اما انتاج الحامض في الانبوب غير المغطى وتغير اللون دليل على الاكسدة .

الوسط Media

اذابة (٢ غم) من الكازائين المهضوم Pancreatic digest of casein ، و (١٠,٠ مل) من الكليسرول glycerol ، (٠,٠٣ غم) احمر الفينول (طريقة King)، و(٣ غم) من الاكار ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٣ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^2 لمدة ١٥ دقيقة.ثم يوزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- لتحديد انتاج الحامض من الكربوهيدرات ، يلقح وسط الاكار (اذ يحتوي كل وسط نوعا واحدا من الكاربوهيدرات) ببكتيريا بعمر (١٨ – ٢٤) ساعة وذلك بالطعن (٤ – ٥) مرات بعمق (١ سم) بوساطة ناقل معدني مستقيم (ابرة). ملاحظة / انبوبتان من وسط الكلوكوزOF الملقحة، يضاف الى سطح احداها فازاين ذائب او البارافين المعقم للكشف عن التخمر.

٢- تحضن الانابيب بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° بظروف هوائية لمدة (٧) ايام.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة :انتاج الحامض (A) يتحول اللون في عمق الانبوبة الحاوية الكاربوهيدرات الى الاصفر .

* نتيجة موجبة ضعيفة (AW)Weak-positive : تكون الحامض ضعيف يستدل عنه عن طريق مقارنة الانابيب الحاوية على الكاربوهيدرات مع الانابيب غير الحاوية الكاربوهيدرات.اغلب البكتيريا التي تنمو في وسط الأساس (OF-base) تنتج تفاعل قاعدي. اذا يكون لون الوسط في الانبوب الحاوي على الكربوهيدرات مماثل للون الوسط في الانبوبة غير الملقحة، واذا كان لون الوسط في انبوبة السيطرة الملقحة يصبح احمرغامقا (قاعديا) فان النمو يعد موجبا ضعيفا ، على افتراض مقدار النمو هو نفسه في كلا الأنبوبين .

* النتيجة السالبة : لون احمر او قاعدي alkaline (K) في عمق الانبوبة الحاوية للكاربوهيدرات مماثل الى لون أنبوب السيطرة الملقحة.

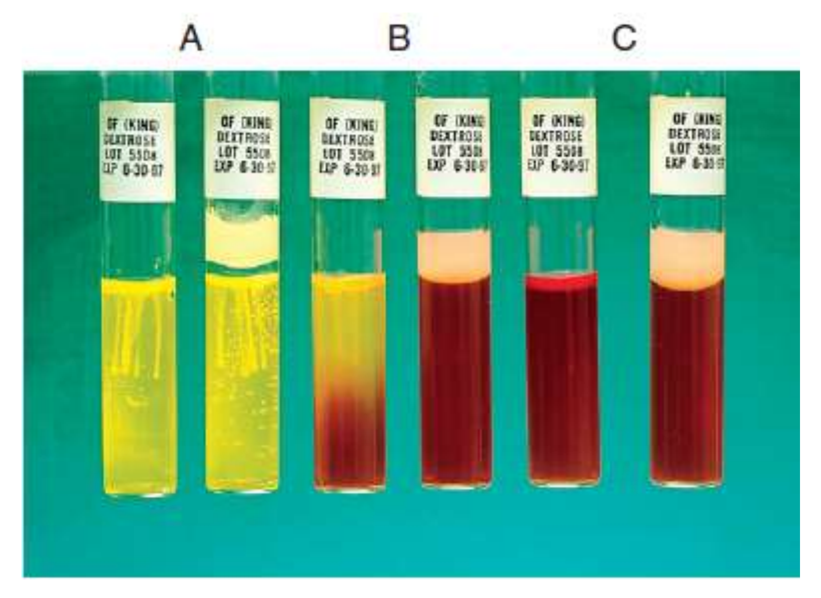
* عدم تغييراللون No change(NC) او متعادل(Neutral (N : يوجد نمو في الوسط ، والوسط الحاوي للكربوهيدرات ووسط السيطرة يتحول قاعديا (احمر).

* البكتريا التي لا تنمو نهائيا على وسط (OF) ، توضع علامة No growth(NG) .

الملاحظات :

*نمو البكتيريا البطيء قد لايعطي نتائج لعدة ايام .

*اذا كانت الانابيب ذات غطاء محكم فيجب ترك الغطاء مفتوحا قليلا اثناء مدة الحضن للسماح بتبادل الهواء، اذ ان انبوب السيطرة والانابيب الحاوية للكربوهيدرات التي لاتتأكسد ربما لا تصبح قاعدية alkaline .



الشكل (٥١)اختبارOxidation/Fermentation .

A:التخمر B:مؤكسد c:غير مستهلك

اختبار Oxidation–Fermentation (O–F) Test (اختبار ثاني)

اضافة الطريقة الثانية

الوسط الزرعي Hugh and Leifson’s O–F Medium with Glucose

أذابة (٢ غم) من الكازائين المهضوم Pancreatic digest of casein ، (٥ غم) كلوريد الصوديوم Sodium chloride ، (٠,٣ غم) فوسفات البوتاسيوم الثنائي Dipotassium phosphate ، (٢,٥ غم) اكار Agar ، (٠,٠٨ غم) بروم ثايمول الازرق Bromthymol blue ، (١٠ غم) كلوكوز Glucose ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى (6.6 - 7.0 ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مللتر ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة..ثم يوزع في انابيب .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

١- تسجيل اسم البكتيريا المراد اختبارها على الانابيب الحاوية للوسط مع اضافة انبوب سيطرة (مكررين لكل سكر).
٢- يلقح كل الانابيب بطريقة الطعن بالبكتيريا المراد اختبارها مع انابيب السيطرة،.
٣- يغطى مكرر واحد من كل الانابيب بضمنها انابيب السيطرة بزيت معدني معقم بسمك (٣ – ٤)ملم .
٤- تحضن الانابيب هوائيا بدرجة حرارة (٣٥) م° لمدة (٤٨) ساعة.
٥- اختبار الانابيب للكشف عن تغير لون الوسط ، ويجب مقارنة الانابيب الملقحة بأنابيب السيطرة.

النتائج المتوقعة Expected Results

الجدول (٦) نتائج اختبار الاكسدة /الاختزال

Sealed	Unsealed	Interpretation	Symbol
Green or blue	Any amount of yellow	Oxidation	O
Yellow throughout	Yellow throughout	Oxidation and fermentation or fermentation only	O-F or F
Slightly yellow at the top	Slightly yellow at the top	Oxidation and slow fermentation or slow fermentation only	O-F or F
Green or blue	Green or blue	No sugar metabolism; organism is nonsaccharolytic	N

اختبار Phenylalanine Deaminase Agar

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة البكتيريا لانتزاع الامين تأكسديا من الفنيل الانين phenylalanine وتحويله الى حامض فنيل بايروفك phenylpyruvic acid، وبوساطة هذا الاختبار يمكن تمييز جنس *Morganella* ، *Proteus* ، و *Providencia* من العائلة المعوية Enterobacteriaceae.

مبدأ الاختبار Principle

تقوم البكتيريا التي تنتج انزيم phenylalanine deaminase بأزالة الامين (NH_2) من phenylalanine، ويكون ناتج التفاعل الامونيا (NH_3) و phenylpyruvic acid . ويكشف عن الاخير بأضافة بضع قطرات من كلوريد الحديديك ferric chloride بتركيز (١٠ %)، يتكون لون اخضر معقد بين المركبين.

الوسط Media

اذابة (٢ غم) من فنيل ألانينPhenylalanine ، (٣ غم) خلاصة الخميرة، (٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl، (١ غم) فوسفات ثلاثي الصوديوم Na3PO4، و (١٢ غم) اكار agar ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٣ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة.ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

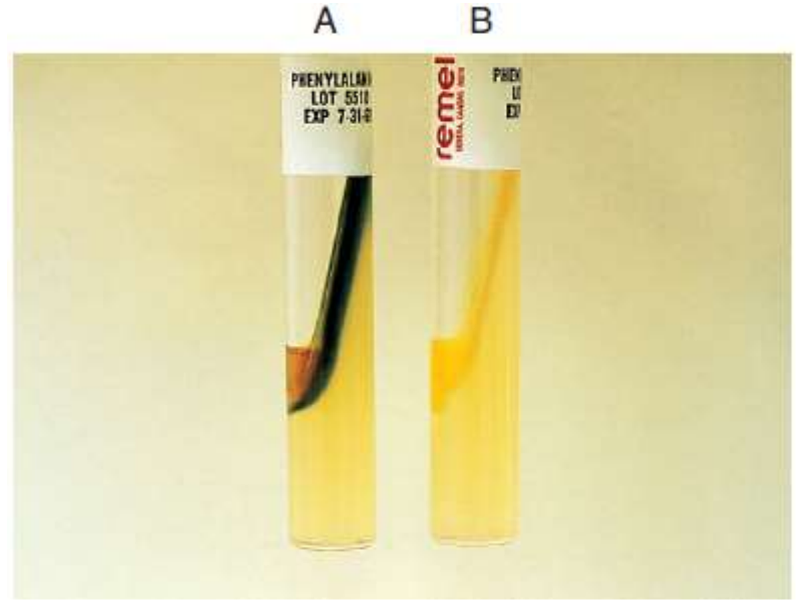
طريقة العمل Method

١- يلقح سطح الوسط الفنيل ألانين phenylalanine المائل بقطرة واحدة من مزرعة بكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل (brain-heart infusion broth) بعمر (٢٤ ساعة) .
٢- يحضن من (١٨ – ٢٤) ساعة (او لحين ظهور نمو واضح) بدرجة (٣٥ – ٣٧) م°في ظروف هوائية مع بقاء غطاء الانبوب مفتوحا قليلا .
٣- يضاف (٤ – ٥) قطرات من كلوريد الحديديك ferric chloride السائل على السطح المائل للوسط بعد انتهاء الحضن.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : ظهور اللون الاخضر على السطح المائل بعداضافة كلوريد الحديديك ferric chloride .الشكل (٥٢– A).

* النتيجة السالبة : عدم ظهور لون على سطح الوسط المائل بعد اضافة كلوريد الحديديك ferric chloride. الشكل (٥٢ – B).



الشكل(٥٢):اختبار Phenylalanine Deaminase

A نتيجة موجبةPositive . B : نتيجة سالبةNegative.

Phenylalanine: $C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

$\xrightarrow[\frac{1}{2}O_2 \;\rightarrow\; H_2O]{\text{phenylalanine deaminase}}$ $\xrightarrow[\rightarrow\; NH_3]{H_2O}$

Phenylpyruvic acid: $C_6H_5-CH_2-C(=O)-COOH$

الشكل (٥٣)ازالة مجموعة الامين من الحامض الاميني Phenylalanine

$$\text{Phenylpyruvic Acid} + FeCl_3 \longrightarrow \text{Green Color}$$

الشكل (٥٤)دليل التفاعل

ازالة مجموعة الامين من الحامض الاميني Phenylalanine يؤدي الى تكوين حامض phenylpyruvic الذي يتفاعل مع كلوريد الحديد FeCl3 مما يؤدي الى تكون لون اخضر يدل ايجابية الاختبار

اختبار L-PyrrolidonylArylamidase (PYR) Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص بكتيريا المكورات العقدية مجموعة A A streptococci (*pyogenesStreptococcus*) و المكورات المعوية enterococci بوساطة وجود انزيم L-pyrrolidonylarylamidase .

مبدأ الاختبار Principle

يحلل انزيم *L*-pyrrolidonylarylamidase المادة الأساس L-pyrrolidonyl- β-naphthylamide مائيا لانتاج

β-naphthylamin. والاخير يمكن ان يكشف عنه بوجود كاشف N،N-methylaminocinnamaldehyde وذلك بتكوين راسب احمر براق.

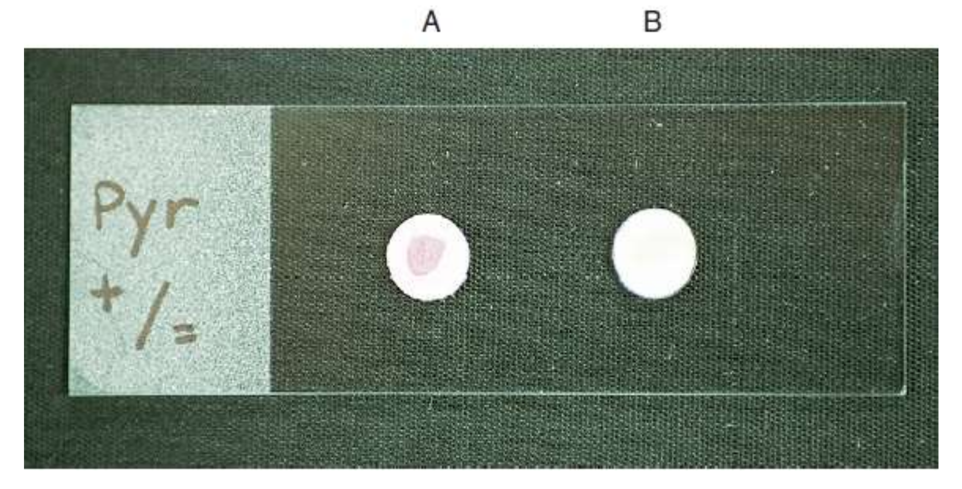
طريقة العمل Method

١- يبلل قرص بصورة خفيفة بالكاشف المائي reagent-grade water،ولايغمر القرص كليا .
٢- يمزج (فرك) بكمية قليلة من عدة مستعمرات نقية بعمر (١٨ – ٢٤) ساعة باستعمال ناقل خشبي على قرص PYR.
٣- يحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٢ – ٥) دقائق.
٤- يضاف قطرة من الكاشف،N,N-dimethylaminocinnamaldehyde وملاحظة ظهور لون احمر خلال دقيقة؟

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : لون احمر براق خلال (٥) دقائق . الشكل (٥٥- A).

* النتيجة السالبة : عدم ظهور اللون او لون برتقالي . الشكل (٥٥- B).



الشكل (٥٥) : اختبار PYR test . A : نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبةNegative .

اختباروسط البايروفيت السائل Pyruvate Broth

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قابلية او قدرة البكتيريا على استهلاك البايروفيت pyruvate، اذ يساعد في التمييز بين بكتيريا *Enterococcus faecalis* (موجبة للاختبار) و *Enterococcus faecium* (سالبة الاختبار).

مبدأ الاختبار Principle

يعد وسط البايروفيت السائل محدد المغذيات اذا يكون خاليا من الكربوهيدرات ، اضيف له حامض البايروفيك لتحديد قابلية البكتيريا على استعمال البايروفيت وتكوين حوامض ايضية metabolic acids ،اذ يتغير لون الدليل Bromthymol blue الى الاصفر بوجود الحوامض كنتيجة لانخفاض الاس الهيدروجيني.

الوسط Media

أذابة (١٠ غم) من الكازائين المهضوم Pancreatic digest of casein ، (١٠ غم) حامض البايروفيك صوديوم pyruvic acid sodium، (٥ غم) خلاصة الخميرة yeast extract ، (٥ غم) فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K2HPO4 ، (٥ غم) من كلوريد الصوديوم NaCl ، (٤٠ غم) ازرق بروم ثايمول Bromthymol blue ، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل

الاس الهيدروجيني الى ٧,٣ و يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة .ثم وزع في انابيب.(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

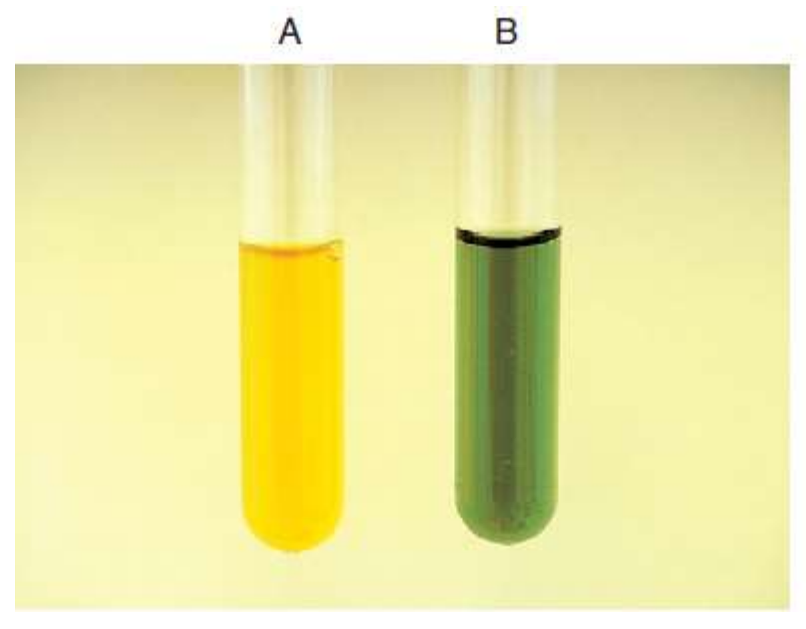
١- يلقح وسط البايروفيت السائل بالبكتيريا (بالشكل خفيف) النامية في مزرعة اكار الدم بعمر (١٨ -٢٤) ساعة .

٢- يحضن الوسط بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° في ظروف هوائية لمدة من (٢٤ – ٤٨) ساعة .

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : يتغير الدليل اللوني من الاخضر الى الاصفر . الشكل (٥٦ – A).

* النتيجة السالبة : عدم تغير اللون ، الاصفر - الاخضر يدل ضعف التفاعل وتسجل نتيجة سالبة. الشكل (٥٦ – B).



الشكل (٥٦): اختباروسط Pyruvate Broth. A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبة Negative.

اختبار تحمل الملح Salt Tolerance Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار في تحديد قابلية البكتيريا على النمو في وسط ملحي عالي التركيز. ويستعمل للتمييز بين المكورات المعوية (موجبة الاختبار) من المكورات غير المعوية (سالبة الاختبار).

مبدأ الاختبار Principle

اختبار التحمل الملحي هو وسط تفريقي وانتقائي ، اذ ان المكورات المعوية مقاومة للتراكيز الملحية العالية . يستعمل لهذا الاختبار وسط نقيع القلب السائل heart infusion broth الحاوي (٦,٥%) من كلوريد الصوديوم NaCl ويحتوي كمية قليلة من الكلوكوز و كاشف bromocresol purple، كدليل لوني على انتاج الحامض.

الوسط Media

يمكن استعمال وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-heart infusion broth (BHI) بأضافة كلوريد الصوديوم و دليل لوني بدل عن استعمال المكونات المفردة.

المكونات :اذابة (١٠ غم) قلب مهضوم Heart digest ، (١٠ غم) نسيج حيواني مهضوم انزيميا Enzymatic digest of animal tissue ، (٦٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl ، (١ غم) دكستروز dextrose ، (٠,٠١٦ غم) ازرق بروم ثايمول Bromthymol blue ، في كمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{2} لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب.(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم) .

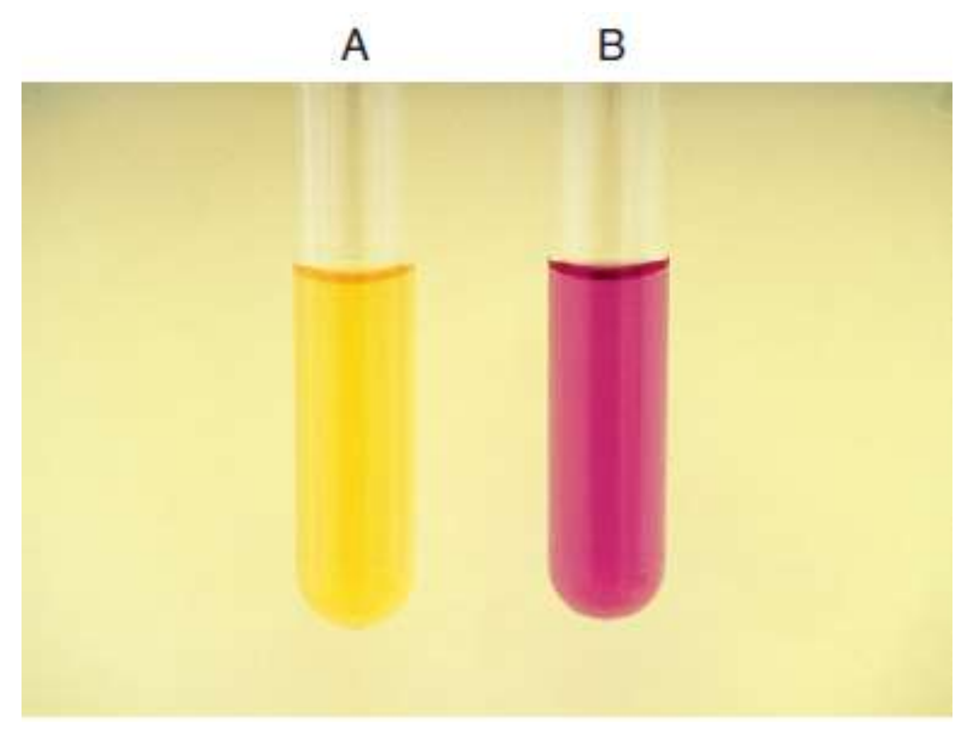
طريقة العمل Method

١- تنقل مستعمر او مستعمرتان من مزرعة بكتيرية بعمر (١٨ – ٢٤) ساعة الى وسط سائل حاو على (٦,٥%) . باستعمال ناقل معدني
٢- تحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° في ظروف هوائية لمدة (٤٨) ساعة .
٣- اختبار يومي للكشف عن النمو.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تكون عكارة مرئية في الوسط السائل، تغير او عدم تغير اللون من الارجواني الى الاصفر. الشكل (57 – A).

* النتيجة السالبة : عدم تكون عكارة وعدم تغير اللون . الشكل (57 – B).



الشكل (٥٧): اختبار تحمل الملح Salt Tolerance Test

A: النتيجة الموجبة Positive. B: النتيجة السالبة Negative.

اختبار بقعة الاندول Spot Indole Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد وجود انزيم Tryptophanase ، وهو اختبار سريع يستعمل بدلا من طريقة الانابيب التي ذكرت في اختبار (الشكل ٢٧).

مبدأ الاختبار Principle

يكسر انزيم Tryptophanaseالتربتوفان ليحرر الاندولIndole ، الذي يكشف عنه بوساطة قابليته للاتحاد مع الالديهايد aldehydes لتكوين مركب ملون ، البكتيريا الموجبة لانتاج الاندول يتكون مركب لوني (الازرق- الاخضر) بوساطة تفاعل الاندول Indole مع سينمالديهايد Cinnamaldehyde الذي يسهل رؤيته ، وعدم تكون اللون عند غياب الانزيم (اندول سالب).

طريقة العمل Method

١- تشبع قطعة من ورق الترشيح بـ (١ %) من كاشف Paradimethyl amino cinnamaldehyde.

٢- تنقل جزء صفير من المستعمرة البكتيرية من سطح الاكار وتمزج (فرك) العينة على سطح ورقة الترشيح. باستعمال ناقل خشبي ، والتغير السريع الى اللون الازرق يدل على النتيجة الموجبة للاختبار. معظم البكتيريا الموجبة لاختبار الاندول تحول الى الون الازرق خلال (٣٠ ثانية).

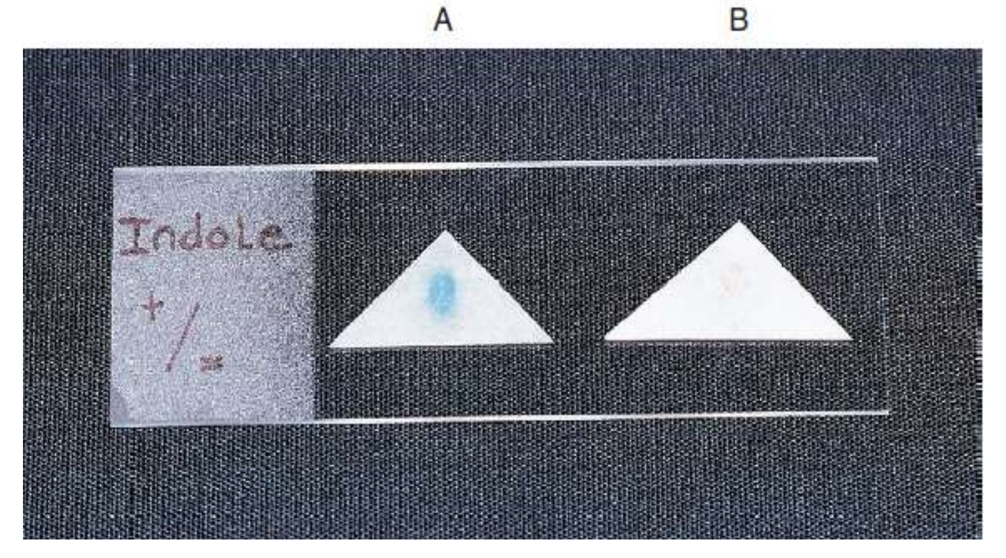
النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تغير اللون الى الازرق خلال (٢٠ ثانية) الشكل (58 – A).

* النتيجة السالبة: عدم تغير اللون او ظهور لون وردي خفيف. الشكل (58 – B).

الملاحظات :

* عدم استعمال بكتيريا نامية على وسط MacConkey agar في هذا الاختبار وذلك بسبب لون المستعمرات المخمرة للاكتوز على هذا الوسط الذي سوف تتداخل مع تفسير نتائج الاختبار.



الشكل (٥٨) : اختبار بقعة الاندولSpot Indole Test. A: النتيجة موجبة Positive. B: النتيجة سالبة Negative .

اختبار حديد السكر الثلاثي Triple Sugar Iron Agar (TSI)

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد بكتيريا العصيات السالبة لصبغة كرام التي تخمر الكلوكوز Glucose، اللاكتوز lactose و السكروز sucrose وتكون كبريتيد الهيدروجين Hydrogen sulfide(H2S). يستعمل الاختبار بالشكل اولي لتمييز اعضاء بكتيريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae من العصيات السالبة لصبغة كرام.

مبدأ الاختبار Principle

يتكون الوسط TSIمن (١٠) اجزاء من اللاكتوز ، (١٠) اجزاء من السكروز ، (١) جزء واحد من الكلوكوز والببتون،احمر الفينول Phenol red و كبريتات الحديدوز ferrous sulfate يعملان كدليل للحموضة acidification وتكوين كبريتيد الهيدروجين H2S على التوالي. البكتيريا التي تخمر الكلوكوز تحول كل الوسط الى الحامضي (اصفر) خلال (٨ – ١٢) ساعة. يكون قعر الانبوب حامضيا بعد مدة الحضن الكاملة، بسبب تكون الاحماض العضوية الناتجة من تخمر الكلوكوز تحت ظروف لاهوائية في قعر الانبوب، وبالرغم من ذلك يتحول سطح الوسط المائل الى الحالة القاعدية (احمر) بسبب اكسدة نواتج التخمر تحت

ظروف هوائية، وهذا التغير ناتج من تكوين ثنائي اوكسيد الكاربون CO_2 والماء H_2O واكسدة الببتونات في الوسط الى امينات قاعدية alkaline amines . فضلا عن تخمر الكلوكوز ، اللاكتوز و- او السكروز ،وان تكوين كميات كبيرة من نواتج التخمر على سطح الوسط المائل تعادل الامينات القاعدية وتجعل السطح المائل حامضي (اصفر)، على ان يقرأ التفاعل خلال (١٨ – ٢٤) ساعة . التفاعلات في وسط TSI يجب ان تقرأ بعد (٢٤) ساعة من الحضن لانتاج حصيلة الاكسدة الهوائية لنواتج تخمر اللاكتوز و او السكروز ، واخيرا يعود سطح الوسط المائل الى الحالة القاعدية.

ان تكوين غاز ثنائي اوكسيد الكاربونCO_2 وغاز الهيدروجين H_2 الذي يستدل عليه بظهور فقاعات او شقوق في الاكار او بوساطة انفصال الاكار من قعر الانبوب فضلا عن انتاج H_2S (الناتج من اختزال الثايوسلفات الصوديوم sodium thiosulfate الى H_2S) والذي يتطلب بيئة حامضية وتفاعل مع سترات امونيوم الحديديك ferric ammonium citrate لينتج عنه اسوداد في قعر اكار الانبوب.

الوسط Media

اذابة (٥غم) كازائين مهضوم انزيميا Enzymatic digest of casein ، (٥ غم) من نسيج مهضوم انزيميا enzymatic digest of animal tissue ، (١٠ غم) yeast enriched peptone، (١ غم) دكستروز dextrose ، (١٠ غم) لاكتوز lactose، (١٠ غم) سكروز sucrose ، (٠,٢غم) سترات امونيوم الحديديك ferric ammonium citrate، (٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl ، (٠,٣ غم) ثايوسلفات الصوديوم sodium thiosulfate ، (٠,٠٢٥ غم) احمر الفينول Phenol red، (١٣,٥ غم) اكار، في كمية من الماء المقطر ثم يعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٣ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند/انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب وتترك بالشكل مائل لحين تصلبها. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم).

طريقة العمل Method

١- لمس سطح المستعمرة النقية باستعمال ناقل معدني مستقيم
٢- يلقح مركز الوسط TSI بالطعن الى قعر الانبوب ومن ثم تخطيط السطح الوسط المائل. الشكل(٥٩ – D) .
٣- تحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° في ظروف هوائية لمدة (١٨ – ٢٤) ساعة . مع غلق الغطاء قليلا

النتائج المتوقعة Expected Results

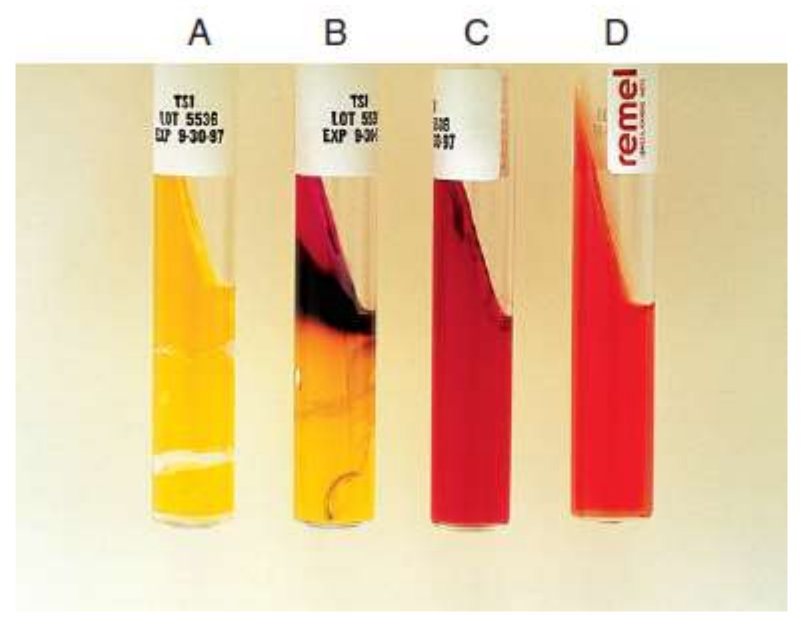
* سطح الوسط القاعدي Alkaline/ عدم تغيرلون القعر الوسط no change (K/NC): الكلوكوز ، اللاكتوز و السكروز غير مستهلكة وربما يسجل (K/K) سطح الوسط قاعدي alkaline / القعر قاعدي alkaline الشكل(C – 59) .

*سطح الوسط قاعدي alkaline/ القعر حامضي acid (K/A): تخمر الكلوكوز فقط.

*سطح الوسط حامضي acid / القعر حامضي acid (A/A): تخمر كلوكوز ، سكروز و/ او اللاكتوز. الشكل(A – 59).

ملاحظة : ظهور راسب اسود في قعر الانبوب دلالة على انتاج كبريتيد الحديدوز ferrous sulfide و غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S+) الشكل (٥٩ –B) . ظهور الفقاعات او تشققات في الانبوب دلالة على انتاج CO_2 او H_2 .

* يشير حرف الـ A الى ان البكتيريا تخمر الكلوكوز والسكروز ، الكلوكوز واللاكتوز ، او الكلوكوز والسكروز و اللاكتوز ، مع انتاج غاز.



الشكل (٥٩) : اختبار وسط الحديد الثلاثي السكر : A: سطح الوسط المائل حامضي acid / قعر حامضي acid مع غاز ، بدون H_2S (A/A)،

B: سطح الوسط المائل قاعدي alkaline/ قعر حامضي acid بدون غاز موجود H2S(K/A H2S+) ، C : سطح الوسط المائل قاعدي alkaline / قعر قاعدي alkaline بدون غاز و H2S(K/K) . D: انبوب غير ملقح .

الجدول (٧) نتائج اختبار وسط TSI

Bacterium	TSI Reaction			
	Butt	Slant	H_2S	Gas
Enterobacter	A	A	–	+
Escherichia	A	A or K	–	+
Klebsiella	A	A	–	+
Citrobacter	A	K or A	V	+
Proteus vulgaris	A	A or K	+	+
Edwardsiella	A	K	V	+
Morganella	A	K	–	+
Serratia	A	K or A	–	V
Shigella	A	K	–	–
Salmonella typhi	A	K	+	–

A = acid, K = alkaline, V = varies between species

اختبار كلكلر اكار الحديد Kligler Iron Agar

أذابة (١٠ غم) كازائين مهضوم انزيميا pancreatic digest of casein ، (١٠ غم) نسيج حيواني مهضوم ببتيديا Peptic Digest of Animal Tissue ، (١٠ غم) لاكتوز Lactose ، (١ غم) كلوكوز (glucose)، (٠,٥غم) سترات الامونيوم الحديدية Ferric Ammonium Citrate، (٥غم) كلوريد الصوديوم Sodium chloride ، (٠,٥ غم) ثايوسلفات الصوديوم Sodium thiosulfate ، (١٥ غم) اكار Agar ، (٠,٠٢٥غم) فينول الاحمر Phenol red، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى 7.2_7.6 ثم يكمل الحجم الى ١,١ لتر ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة .

الجدول (٨) نتائج اختبار KIA

Result	Interpretation	Symbol
Yellow slant/yellow butt—KIA	Glucose and lactose fermentation with acid accumulation in slant and butt.	A/A
Yellow slant/yellow butt—TSIA	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation with acid accumulation in slant and butt.	A/A
Red slant/yellow butt	Glucose fermentation with acid production. Proteins catabolized aerobically (in the slant) with alkaline products (reversion).	K/A
Red slant/red butt	No fermentation. Peptone catabolized aerobically and anaerobically with alkaline products. Not from *Enterobacteriaceae*.	K/K
Red slant/no change in the butt	No fermentation. Peptone catabolized aerobically with alkaline products. Not from *Enterobacteriaceae*.	K/NC
No change in slant / no change in butt	Organism is growing slowly or not at all. Not from *Enterobacteriaceae*.	NC/NC
Black precipitate in the agar	Sulfur reduction. (An acid condition, from fermentation of glucose or lactose, exists in the butt even if the yellow color is obscured by the black precipitate.)	H_2S
Cracks in or lifting of agar	Gas production.	

اختبار اليوريز Urease Test

A/اختبار اليوريز بطريقة كرستنسن

Urease Test (Christensen's Method)

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار لتحديد قابلية البكتيريا على انتاج انزيم اليوريز Urease، الذي يحلل اليوريا مائيا. تشخص بكتيريا *Proteus* sp. بوساطة قدرتها السريعة على تحلل اليوريا مائيا.

مبدأ الاختبار Principle

تنتج اليوريا من نزع الكاربوكسيل decarboxylation من الاحماض الامينية، وتحلل اليوريا مائيا ينتج امونيا وCO_2 . ان انتاج الامونيا يجعل لوسط قاعديا، ويكشف عنه بواساطة الاس الهيدروجيني و تغير لون احمر الفينول Phenol red من البرتقالي الخفيف في (PH 6.8) الى اللون الاحمرالمائل للارجواني (وردي) في (pH 8.1).

البكتيريا الموجبة السريعة لاختبار اليوريزتحول الوسط الى اللون الوردي خلال (٢٤) ساعة . اما الموجبة الضعيفة قد تحتاج عدة ايام، والسالبة لا تنتج لونا او لونا اصفر كنتيجة لانتاج الحامض .

الوسط Media

اذابة (١غم) جيلاتين مهضوم انزيميا Enzymatic digest of gelatin، (١غم) دكستروز dextrose ، (٥ غم) كلوريد الصوديوم NaCl ، (٢ غم) فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH2PO4 ، (٢٠ غم) يوريا Urea ، (٠,٠١٢) احمر الفينول phenol red، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١مْ وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب. (ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

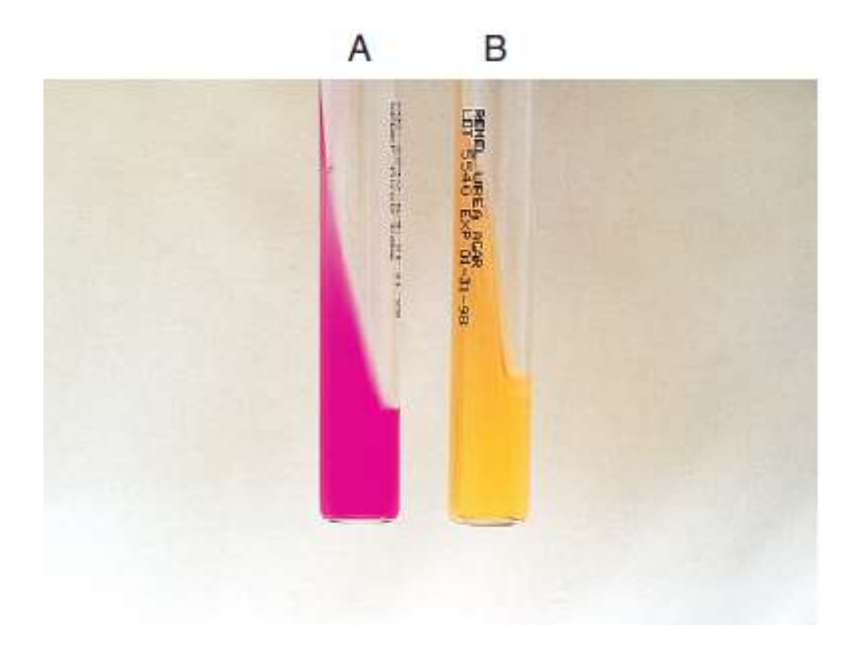
١- يلقح سطح اليوريا المائل بطريقة التخطيط بجزء من مستعمرة معزولة نقية، او يلقح سطح الوسط المائل باضافة (١ -٢) قطرة من مزرعة بكتيرية نامية في سط نقيع الدماغ والقلب السائل المحضونة لليلة كاملة.
٢- تحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) مْ في ظروف هوائية لمدة (٤٨) ساعة الى (٧) ايام . مع بقاء غطاء الانبوب مفتوح قليلا (غير محكم الغلق)،

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تغير لون سطح الوسط المائل من البرتقالي الخفيف الى الوردي. الشكل(٦٠ – A).
* النتيجة السالبة : عدم تغير اللون (سطح الوسط المائل والقعر تبقى ذات لون برتقالي خفيف . الشكل(٦٠ – B).

الملاحظات :

١- تظهر التفاعلات القاعدية بعد مدة طويلة من الحضن والتي تنتج من استهلاك الببتون او البروتينات الاخرى التي تؤدي الى رفع الاس الهيدروجين الذي يعطي تفاعلا موجبا خاطئا.
٢- تلغى النتيجة الموجبة الخاطئة باستعمال انبوب يحتوي مادة الوسط الاساسية بدون اليوريا.



الشكل(٦٠): اختبار اليوريزUrease. A: نتيجة موجبة Positive. B: نتيجة سالبة Negative.

B/ اختبار اليوريز بطريقة رستكيانوستاوارت

Rustigian and Stuart's Urea Broth

الوسط Media

اذابة (٠,١غم) من خلاصة الخميرة ، (٩,١ غم) فوسفات البوتاسيوم monobasic،Potassium phosphate ، (٩,٥ غم) فوسفات البوتاسيوم dibasic،Potassium phosphate ، (٢٠ غم) يوريا Urea، (٠,٠١غم) احمر الفينول Phenol red، كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ويوزع في انابيب ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{2} لمدة ١٥ دقيقة ثم وزع في انابيب وتترك بدرجة ٢٥ م .(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method

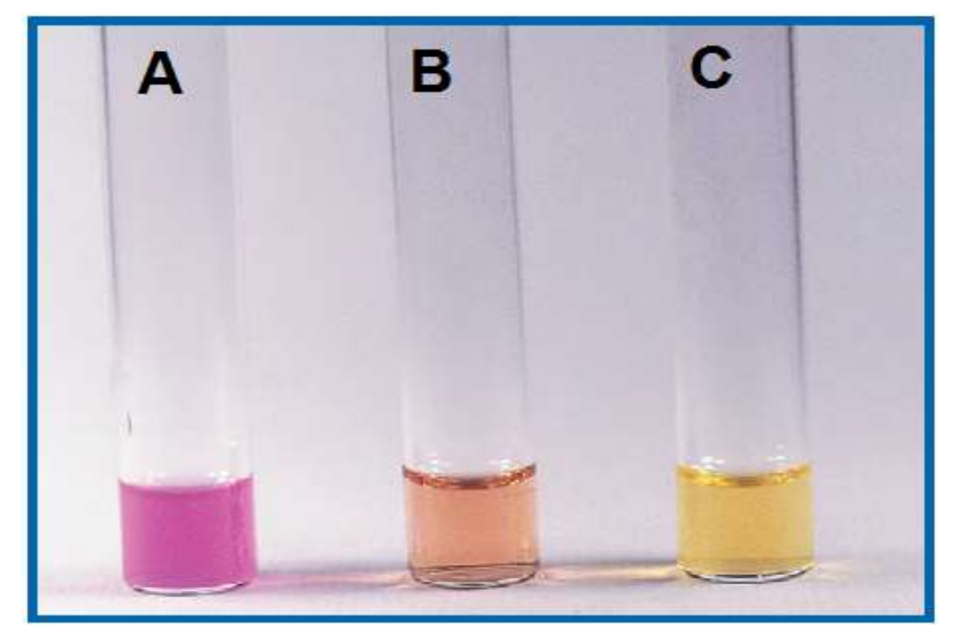
١- تؤخذ انابيب تحوي الوسط السائل لليوريا
٢- تلقح الانابيب بكمية من البكتيريا (كثيفة). وعدم تلقيح انبوبة السيطرة.

٣- حضن الانابيب بظروف هوائية بدرجة حرارة (٣٥) م° لمدة (٢٤) ساعة.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تغير في اللون من البرتقالي الخفيف الى الوردي. الشكل(٦١-A).

* النتيجة السالبة : عدم تغير اللون (تبقى ذات لون برتقالي خفيف) . الشكل(٦١-C).



الشكل(٦١) اختبار اليوريز بطريقة Rustigian and Stuart’s الانبوب على الجانب الايسر (A): موجب النتيجة ،الانبوب في الوسط (B): سيطرة، الانبوب على الجانب الأيمن (C): سالب النتيجة .

اختبار عامل (V،X) X and V Factor Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل اختبار عامل V،X لتمييز انواع بكتيريا *Haemophilus*. ان تنمية اعضاء اجناس بكتيريا *Haemophilus* في المختبر تحتاج عوامل نمو مساعدة، بعض انواع بكتيريا *Haemophilus*spp. تحتاج الى عامل X (hemin) فقط. او عامل V (نيكوتين امايد ادنين داي نوكليوتايد (NAD) nicotinamide adenine dinucleotide) فقط ، او تحتاج الى العاملين معا.

مبدأ الاختبار Principle

يلقح وسط اكار نقيع القلب ، ووسط اكار تربتك الصوياtryptic soy agar، ووسط اكار الهيموفلس *Haemophilus* agar، او اكار المغذي nutrient agar بالبكتيريا المراد اختبارها بطريقة التخطيط، ثم توضع اقراص او اشرطة مشبعة بـ (V،X ، اوXV) على السطح الوسط الملقح ، وبالسماح للعوامل المكملة بالانتشار الى الوسط الزرعي. سوف تنمو البكتيريا فقط حول القرص الذي يجهزها بالعامل المناسب لنمو البكتيريا .

طريقة العمل Method

١- يعمل عالق بكتيري خفيف (٠,٥ مكفرلاند MacFarland) في محلول ملحي معقم (ملاحظة / عدم وضع عامل X في الوسط الذي اخذت منه البكتيريا وكذلك يستعمل ناقل معدني وليس الماسح القطني فيعمل عالق بكتيري).

٢- يغمر ماسح قطني معقم في العالق البكتيري وينشر على سطح الوسط Trypticase soy agar.

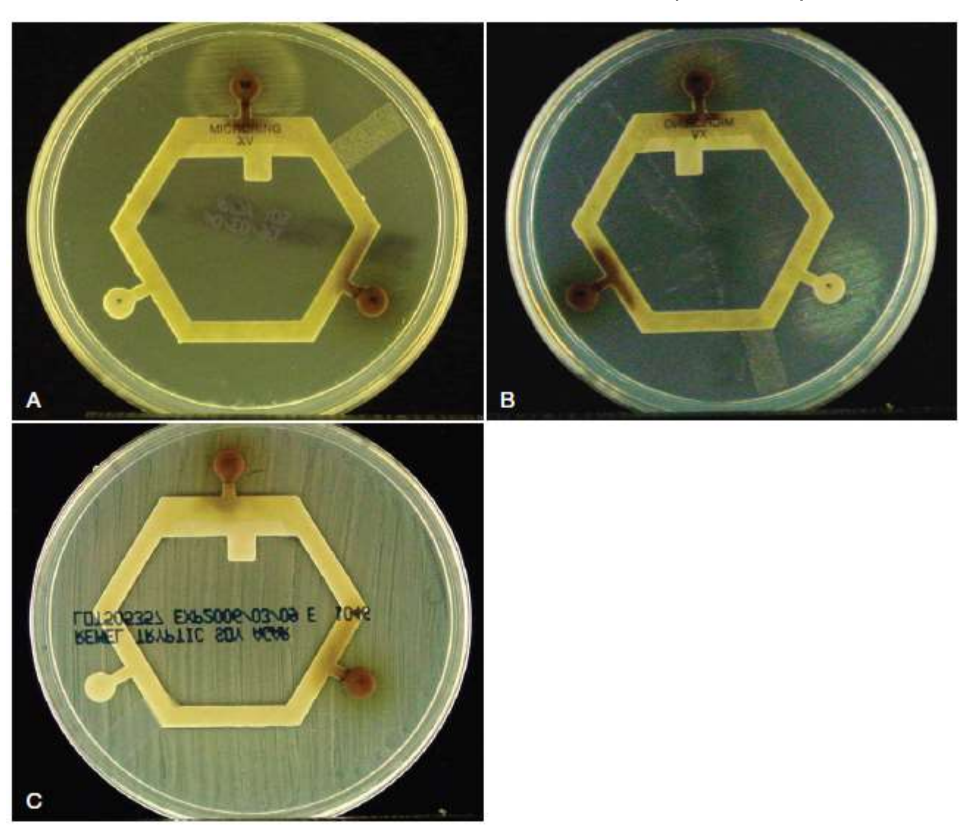
٣- توضع اقراص عامل X ، (V وXV) على سطح الوسط الاكار وبمسافة (٤ – ٥ سم) بين قرص واخر .

٤- تحضن بدرجة حرارة (٣٥ – ٣٧) م° في ظروف هوائية لمدة ٢٤ ساعة .

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : النمو حول اقراص عامل XV فقط ، تحتاج لكلا العاملين. الشكل(٦٢ – A). النمو حول قرص V ، وعدم نمو حول قرص X ، ونمو خفيف حول قرص XV يدل على احتياجه لعامل V . الشكل(٦٢ – B).

* النتيجة السالبة : النمو على سطح الاكار يشير الى عدم الاحتياج الى عامل X او V الشكل(٦٢ – C).



الشكل (٦٢) اختبار عامل (NAD).

A: النتيجة الموجبة : النمو حول قرص XV فقط.

B: النتيجة الموجبة : نمو حول قرص V .

: النتيجة سالبة : نمو على جميع سطح الطبق .

اختبار تحلل النشأ المائي Starch Hydrolysis

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين البكتيريا التي لها القدرة على تحلل النشأ وغير المحللة.

مبدأ الاختبار Principle

تنتج العديد من البكتيريا انزيمات تسمى hydrolases التي تحفز على تجزئة الجزيئات العضوية الى جزيئات اصغر بوجود الماء . يظهر هذا الاختبار تحلل كربوهيدرات النشأ التي تتكون جزيئات من الاميلوزamylose (وهو عبارة عن بوليمر كلوكوز (٢٠٠- ٣٠٠وحدة) غير المتفرع) والاميلوبكتين amylopectin (وهو بولمر كبيرو متفرع)، يتحلل كلاهما مائيا بسرعة بوساطة انزيم الاميليز amylases البكتيري لينتج الدكسترين dextrins، مالتوز Maltose ، والكلوكوز glucose كما يأتي :

Starch [Amylose + Amylopectin] (Large polysaccharide) $\xrightarrow[H_2O]{\alpha\text{-amylase}}$ Dextrins (Intermediate polysaccharides) + Maltose (Disaccharide) + Glucose (Monosaccharide)

الشكل (٦٣) تحلل النشا Starch

يمكن استعمال ايودين كرام Gram's iodine للاشارة الى وجود النشأ ،اذ يكون معه معقد ازرق الى بني اللون ، وان عدم ظهور لون عند اضافة ايودين كرام Gram's iodine الى الوسط الحاوي النشأ والنمو البكتيري (عدم انتاج انزيم الاميليز amylase ا من قبل البكتيريا) ، يدل على عدم تحلل النشا مائيا .

الوسط الزرعي Media

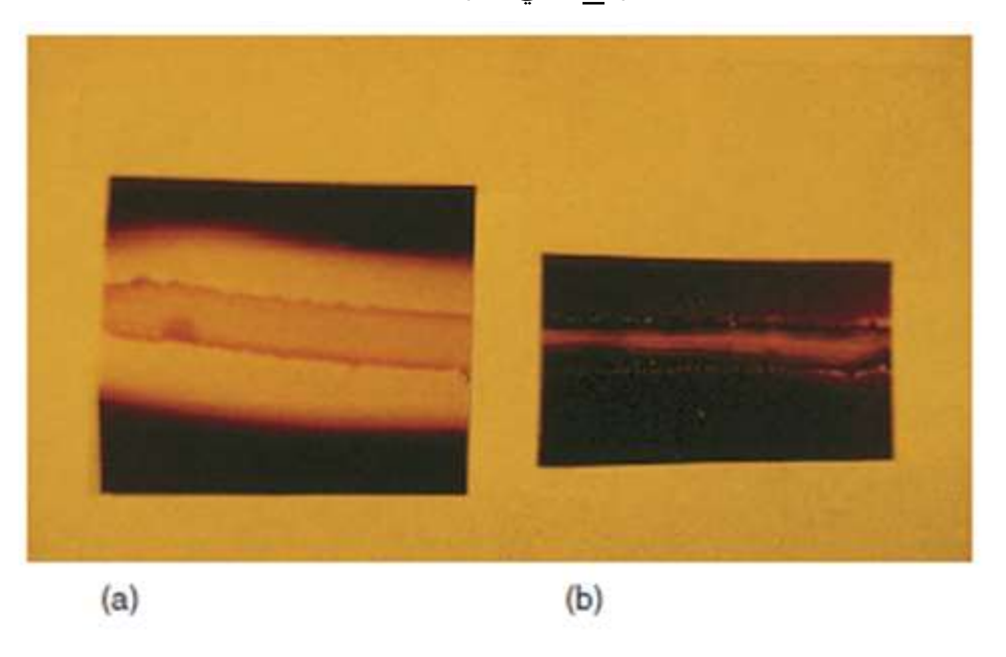
وسط اكار النشأ Starch Agar

اذابة (٣ غم) من خلاصة لحم البقر Beef extract ، (١٠ غم) نشأ قابل للذوبان Soluble starch ، (١٢ غم) اكار Agar ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧,٥ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ،

ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ثم يوزع في اطباق وتترك لحين تصلبها.

طريقة العمل Method

١- يقسم طبق اكار النشأ على مناطق ويعلم بأسم البكتيريا المراد اختبارها .
٢- يلقح الوسط بالبكتيريا على منطقة معينة بالشكل خط مستقيم باستخدم ناقل معدني معقم
٣- يحضن الطبق لمدة (٢٤ - ٤٨) ساعة بدرجة حرارة (35)م° .
٤- يوضع عدة قطرات من ايودين كرام Gram's iodine على كل منطقة ملقحة بالبكتيريا المزروعة على طبق اكار النشأ. ظهور منطقة شفافة حول خط النمو دليل على تحلل النشأ مائيا، والاختبار هو موجب. الشكل(٦٤- A) عدم تكون منطقة شفافة او تحول كل الوسط الى اللون الازرق يدل على عدم تحلل النشأ مائيا، والنتيجة سالبة للاختبار الشكل(٦٤- B).
١- هناك طريقة للنتائج صعبة القراءة ،وهي قلب الطبق بعد ازالة الغطاء على بيكر يحتوي بلورات الايودين ، البخار المتصاعد سيتفاعل مع النشأ بدون تداخل اللون الاحمر _ البني غير المتفاعل للايودين.



(a) (b)

الشكل(٦٤) اختبار التحلل المائي للنشأ Starch hydrolysis.

A: النتيجة موجبة Posative. B: النتيجة سالبة Negative.

اختبار تحلل الدهون Lipid Hydrolysis

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين مجاميع البكتيريا، *Enterobacteriaceae*، *Clostridium, Staphylococcus*, *Neisseria* التي تنتج انزيم اللايبيز الذي يقوم بتحلل الدهون مائيا

مبدأ الاختبار Principle

تتكون الدهون او الكليسيرات الثلاثية من جزيئات الكليسرول التي ترتبط مع الاحماض الدهنية بوساطة اواصر الاستر ، تفرز بعض البكتيريا انزيمات تسمى lipases التي تجزىء الاحماض الدهنية من الكليسيرول ، الاحماض الدهنية والكليسرول تستعمل فيما بعد لاغراض التمثيل الغذائي مثل بناء الفوسفولبيد الذي يدخل في بناء الغشاء البلازمي او يستعمل لعمليات الهدم لانتاج الطاقة . تحلل الدهون الثلاثية وتفكك الأحماض الدهنية إلى سلسلة قصيرة من الأحماض العضوية المتطايرة هي السبب في أن الدهون تصبح متزنخة .يحتوي وسط Spirit blue على الببتون كمصدرللكربون والنيتروجين والفيتامينات،كما أنه يحتوي على ترايبوترين ،وهو من الدهون الثلاثية الحيوانية الطبيعية البسيطة التي تستعمل كمادة اساس لعمل انزيم اللايبيز،وإطلاق الأحماض الدهنية من ترايبوترين عن طريق نشاط اللايبيز ينتج عنه انخفاض في الأس الهيدروجيني PH للوسط وتكون راسبا أزرق داكن اللون،ومع ذلك فإن بعض البكتيريا لا تحلل جميع الأحماض الدهنية من ترايبوترين ونتيجة لذلك لم يتم خفض الاس الهيدروجيني وتكوين راسب ازرق داكن اللون. في هذه الحالة ،

تحضر الاحماض الامينية بطريقتين :-

$$\underset{\text{Triglyceride}}{\begin{matrix} CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_1 \\ | \\ CH-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_2 \\ | \\ CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_3 \end{matrix}} + \underset{\text{Water}}{3H_2O} \xrightarrow{\text{lipases}} \underset{\text{Glycerol}}{\begin{matrix} CH_2-OH \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH_2-OH \end{matrix}} + \underset{\text{Fatty acids}}{\begin{matrix} R_1COOH \\ R_2COOH \\ R_3COOH \end{matrix}}$$

الشكل (٦٥) تحلل جزيئة Triglyceride

A/ الوسط الزرعي Blue Agar (SpiritMedia)

اذابة (٢٠غم) من الاكار ، (١٠ غم) كازائين مهضوم انزيميا Pancreatic digest of casein ، (٥ غم) خلاصة الخميرة Yeast extract، (٠,١٥

غم) Spirit Blue ،في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٨ ويكمل الحجم الى (٩٧٠مل) من الماء المقطر ويمزج جيدا ويسخن ببطء لحين الغليان ثم تعقم بالمؤصدة لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ ، وبعدها يبرد الى درجة (٤٠ – ٥٠) م° . ويضاف (٣٠ مل) مستحلب الدهني Lipoidal emulsion معقم ، يمزج جيدا، ثم يصب في اطباق بتري معقمة مع التحريك المستمر للدورق للحفاظ على انتشار المستحلب ويحفظ في درجة ٢٥ م .

تحضير المستحلب الدهني Lipoidal Emulsion

اضافة (٠,١ مل) Tween™ 80 الى (٤٠٠ مل) من الماء المقطر الدافىء deionized water ، يمزج جيدا ، يضاف (١٠٠ مل) من زيت القطن او زيت الزيتون يستحلب بالخلاط ثم يعقم بالمؤصدة لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢، وبعدها يبرد الى درجة (٤٠ – ٥٠) م° .

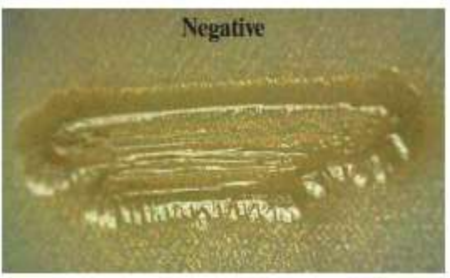
طريقة العمل Method

١- يلقح الطبق بالبكتيريا المراد اختبارها.
٢- يحضن الطبق لمدة(٢٤ – ٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥) م°.
٣- يلاحظ تكون منطقة زرقاء حول النمو البكتيري دليل على التحلل الدهني ، عدم تغير لون الوسط دليل على عدم تحلل الدهون مائيا

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : وجود منطقة زرقاء حول النمو البكتيري. الشكل (٦٦).
* النتيجة السالبة : يبقى لون المنطقة المحيطة بالنمو لون الوسط الزرعي نفسه الشكل(٦٦).





الشكل(٦٦) التحلل الدهني على وسط Spirit (Blue Agar) : النتيجة الموجبة والسالبة.

/B الوسط الزرعي Tributyrin Agar

أذابة (٣ غم) من خلاصة اللحم البقري Beef extract ، (٥ غم) من الببتون Peptone، (١٥ غم) من الاكار ، واضافة (١٠ مل) من Tributyrin oil، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى (5.8–6.2) ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج[٢] لمدة ١٥ دقيقة. وتصب في اطباق وتترك للتصلب

طريقة العمل Method

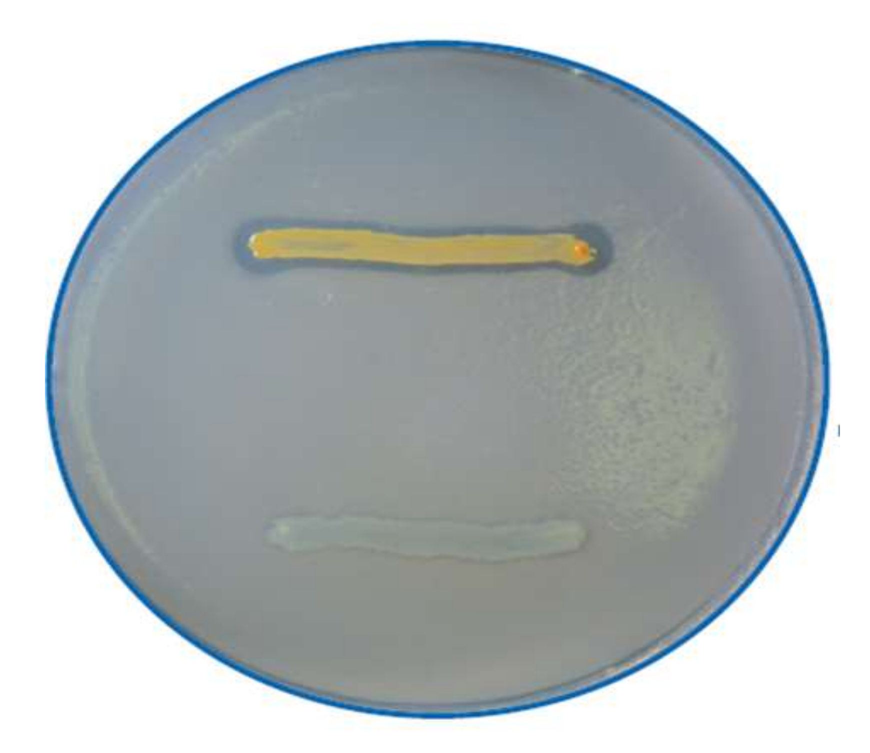
١- يلقح الطبق بالبكتيريا المراد اختبارها .
٢- يحضن الطبق في وضع مقلوب لمدة(٢٤ – ٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥) م°±(٢) م°.
٣- يلاحظ تكون منطقة شفافة حول النمو البكتيري ،وعدم تكون منطقة شفافة يحضن الطبق اضافيا لمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥) م°.

النتائج المتوقعة Expected Results

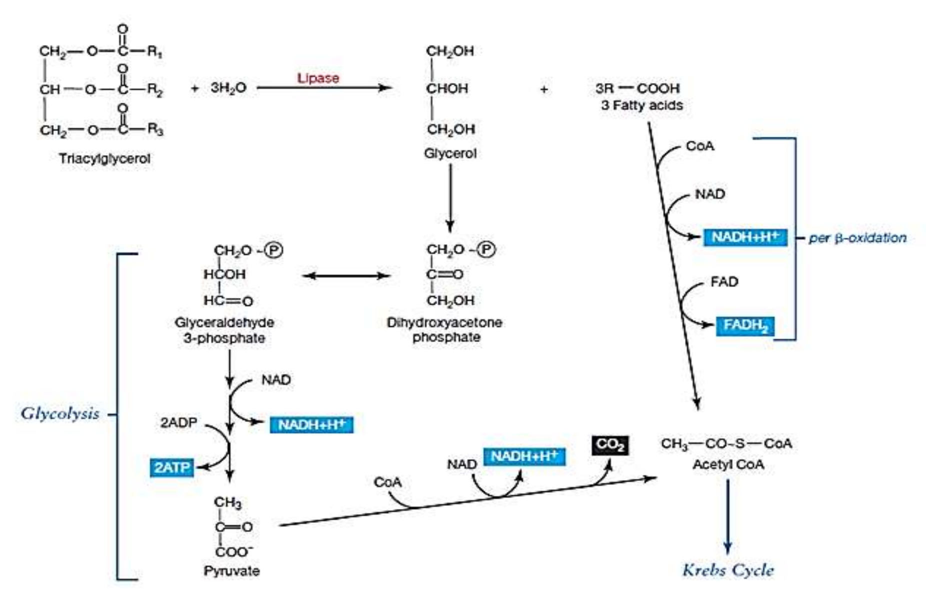
* النتيجة الموجبة : وجود المنطقة الشفافة حول النمو البكتيري، الشكل (٦٧).

* النتيجة السالبة : عدم وجود المنطقة الشفافة حول النمو البكتيري، الشكل(٦٧).

الشكل (٦٨)ايض الدهن: تكون جزيئة الكليسرول الثلاثية من ثلاث ذرات كاربون كحولية (كليسرول) يرتبط بها ثلاثة احماض دهنية ،وينتج من تايضه مركبات تستعمل في التحلل السكري ودورة كربس



الشكل (٦٧) تحلل وسطTributyrin Aga



الشكل (٦٨)ايض الدهن: تكون جزيئة الكليسرول الثلاثية من ثلاث ذرات كاربون كحولية (كليسرول) يرتبط بها ثلاثة احماض دهنية ،وينتج من تايضه مركبات تستعمل في التحلل السكري ودورة كربس

اختبار المالونيت Malonate Test

الغرض من الاختبار Purpose

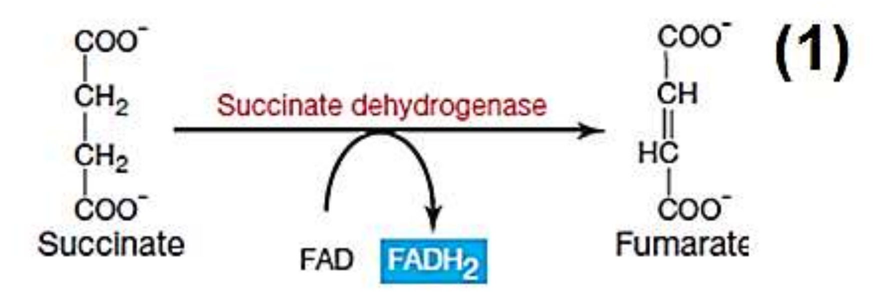
يستعمل اختبار المالونيت Malonate للتمييز بين *Escherichia* التي لاتنمو على الوسط و *Enterobacter* ، ويستعمل كوسط تفريقي بعد توسيعه ليشمل انواع اخرى من العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*.

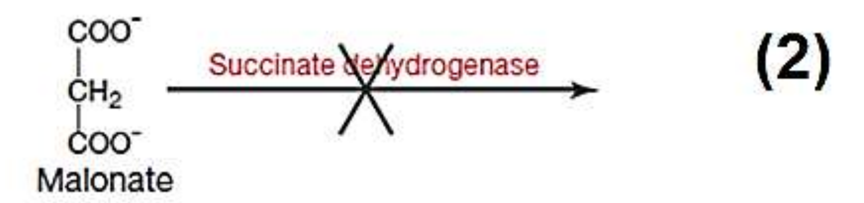
مبدأ الاختبار Principle

يكون المالونيت واحد من التفاعلات الإنزيمية العديدة لدورة كريبس،اذ يتكون من اكسدة السكسونت succinate الى الفيومريت fumarate ، الذي يتطلب انزيم succinate dehydrogenase ويختزل مساعد الانزيم FAD الى FADH2 الشكل(٦٩ معادلة ١).

يضاف المالونيت Malonate (malonic acid) الى الوسط الزرعي الذي يشبه السكسونت ويحل محله كمادة اساسية في التفاعل الشكل (٦٩ معادلة ٢).

ان التثبيط التنافسي لانزيم succinate dehydrogenase وتراكم succinate في الخلايا يؤدي الى توقف دورة كريبس وبالتالي يقتل البكتيريا مالم تستطيع تخمر او استهلاك المالونيت كمصدر اخر وحيد للكاربون . ويعد وسط المالونيت السائل محدد لتلك العمليات ، ويحتوي الوسط على تركيز عالى من مالونات الصوديوم sodium malonate ، خلاصة الخميرة وكمية قليلة جدا من الكلوكوز لتعزيز نموالبكتيريا التي تكون بطيئة النمو بدونه. اضافة دوارئ لمعادلة الوسط الزرعي عند اس هيدروجيني ٦,٧ . صبغة البروم ثيمول الأزرق Bromthymol blue والتي تعطي اللون الاخضر في الانابيب غير الملقحة وتعد دليلا على تغير الـ PH، اذ البكتيريا التي لا تستطيع استهلاك المالونيت وتخمر كمية قليلة الكلوكوز سوف تحول الوسط الى اللون الاصفر الخفيف او لا تغير في اللون وهي بذلك تكون نتيجة سالبة. اما اذا استهلكت البكتيريا المالونايت سوف يكون الوسط قاعديا ويتغير لونه من الاخضر الى الازرق الغامق ، وبذلك تكون النتيجة موجبة.





الشكل (٦٩) التثبيط التنافسي للانزيم Succinate dehydrogenase بوساطة malonate

ترتبط جزيئة malonate بالانزيم مما يعمل على منع ارتباط succinate وتحويله الى fumarate

الوسط الزرعي Media

اذابة (١غم) خلاصة الخميرة Yeast extract، (٢ غم) كبريتات الامونيوم Ammonium sulfate، (٠,٦ غم) فوسفات البوتاسيوم الثنائية Dipotassium phosphate، (٠,٤غم) فوسفات البوتاسيوم الاحادية Monopotassium phosphate ، (٢ غم) كلوريدالصوديوم Sodium chloride، (٣ غم) مالونيت الصوديوم Sodium malonate، (٠,٢٥ غم) كلوكوز Glucose ، (٠,٠٢٥ غم) بروم ثيمول الازرق Bromthymol blue ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى(٦,٥-٦,٩) ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة يوزع في انابيب ويحفظ في درجة ٢٥ م،.(ملاحظة يفضل توزيع الوسط في انابيب ثم تعقم)

طريقة العمل Method.

١- تلقح انابيب الوسط بالبكتيريا المراد اختبارها وعدم تلقيح انبوب السيطرة.
٢- تحضن الانابيب لمدة(٢٤ – ٤٨) ساعة بدرجة حرارة (٣٥) م°±(٢)م°.
٣- ملاحظة تغير اللون في الانابيب.

النتائج المتوقعة Expected Results

* النتيجة الموجبة : تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق الغامق. الشكل (٧٠).
* النتيجة السالبة : تغير لون الوسط الى الاصفر الخفيف او عدم تغير في اللون. الشكل (٧٠).



الشكل (٧٠) اختبار :Malonate

الانبوب في الجانب الايسر موجب النتيجة ، والانبوب في الوسط سيطرة اما الانبوب في الجانب الايمن سالب النتيجة .

اختبار تحلل الكازائين Casein Hydrolysis Test

الغرض من الاختبار Purpose

يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين البكتيريا التي لها القدرة على انتاج انزيم casease والبكتيريا غير المنتجة للانزيم

مبدأ الاختبار Principle

تتطلب العديد من البكتيريا البروتينات كمصدر للأحماض الأمينية والمكونات الأخرى للعمليات البنائية، بعض البكتيريا لديها القدرة على إنتاج وافراز الإنزيمات في البيئة التي تحفز هدم البروتينات الكبيرة إلى ببتيدات اصغر أو الى احماض امينية مفردة والتي يمكن امتصاصها عبرالغشاء البلازمي. تنتج بعض البكتريا انزيم Casease الذي يحلل بروتين الحليب (الكازئين الذي يكسب الحليب اللون الابيض)، إلى اجزاء أصغر، وبذلك يفقد الكازين عادة قوامه غير الشفاف ويصبح شفافا. يكشف عن وجود انزيم casease بوساطة اختبار اكار الحليب Milk agar، ، هو وسط يحتوي على كازائين مهضوم انزيميا pancreatic digest of casein، خلاصة الخميرة Yeast extract، دكستروز dextrose ، مسحوق الحليب powdered milk. عند تلقيح اطباق اكار الحليب بالبكتيريا الموجبة لهذا الاختبار تقوم بأفراز انزيم casease الذي ينتشر في الوسط الزرعي حول المستعمرة البكتيرية وتكون منطقة شفافة نتيجة تحلل الكازائين. اما البكتيريا السالبة للاختبار فلا تنتج انزيم casease ولا تكون منطقة شفافة حول النمو البكتيري.

$H_2N-CH(R)-C(=O)-NH-CH(R)-C(=O)\cdots NH-CH(R)-C(=O)-OH$

protein (n amino acids)

H_2O

chsease

$H_2N-CH(R)-C(=O)-OH$ + $H_2N-CH(R)-C(=O)\cdots NH-CH(R)-C(=O)-OH$

amino acid

protein (n-1 amino acids)

الشكل (٧١) تحلل الكازين :تحلل البروتين يحصل من كسر الاواصر الببتيدية بين الاحماض الامينية ويؤدي الى انتاج ببتيدات او احماض امينية

الوسط Media

اذابة (٥ غم) كازائين مهضوم انزيميا pancreatic digest of casein، (٢,٥ غم) خلاصة الخميرة Yeast extract، (١٠٠ غم) مسحوق حليب غير دسم Powdered nonfat milk ، (١ غم) كلوكوزGlucose ، (١٥ غم) اكار Agar ، في كمية من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٦,٩ – ٧,١ ثم يكمل الحجم الى ١٠٠٠مللتر ، ويعقم بجهاز المؤصدة بدرجة ١٢١م° وبضغط ١٥ باوند /انج٢ لمدة ١٥ دقيقة ويصب في اطباق وتترك لحين تصلبها

طريقة العمل Method

١- يقسم طبق الوسط الزرعي على اجزاء متساوية ويعلم بأسماء البكتيريا المراد اختبارها ومنطقة السيطرة.

٢- يلقح كل جزء بالبكتيريا المراد اختبارها *Bacillus cereus* و*Escherichia coli* مع ترك منطقة السيطرة بدون تلقيح .

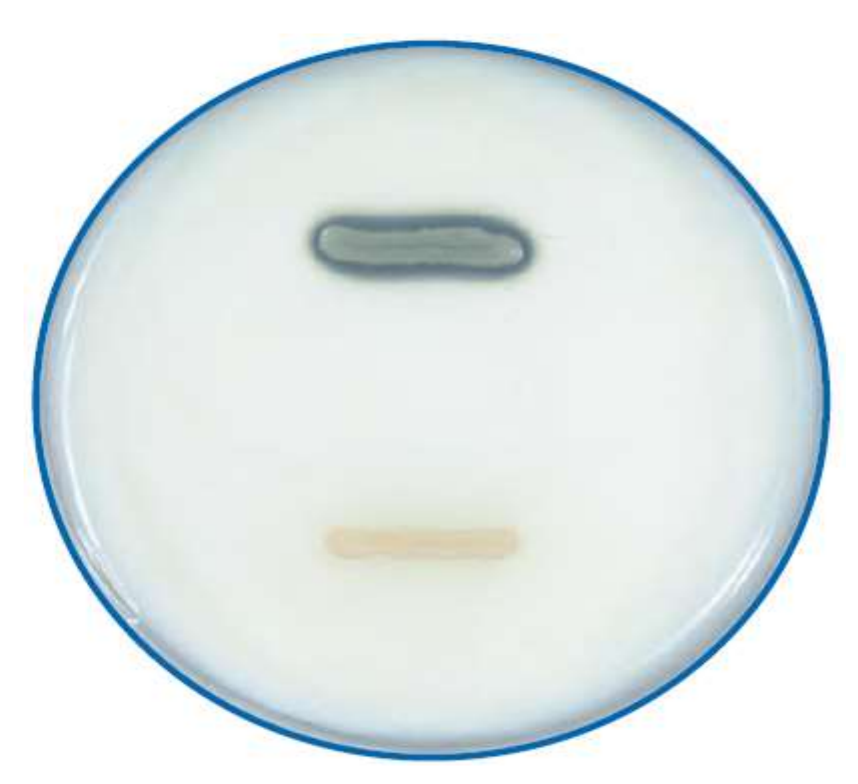
٣- يحضن الطبق بظروف هوائيا بدرجة حرارة (٣٥) م° لمدة (٢٤) ساعة. وبالشكل مقلوب

٤- ياختبار الطبق بملاحظة المنطقة الشفافة حول المستعمرة البكتيرية .

النتائج المتوقعة Expected Results

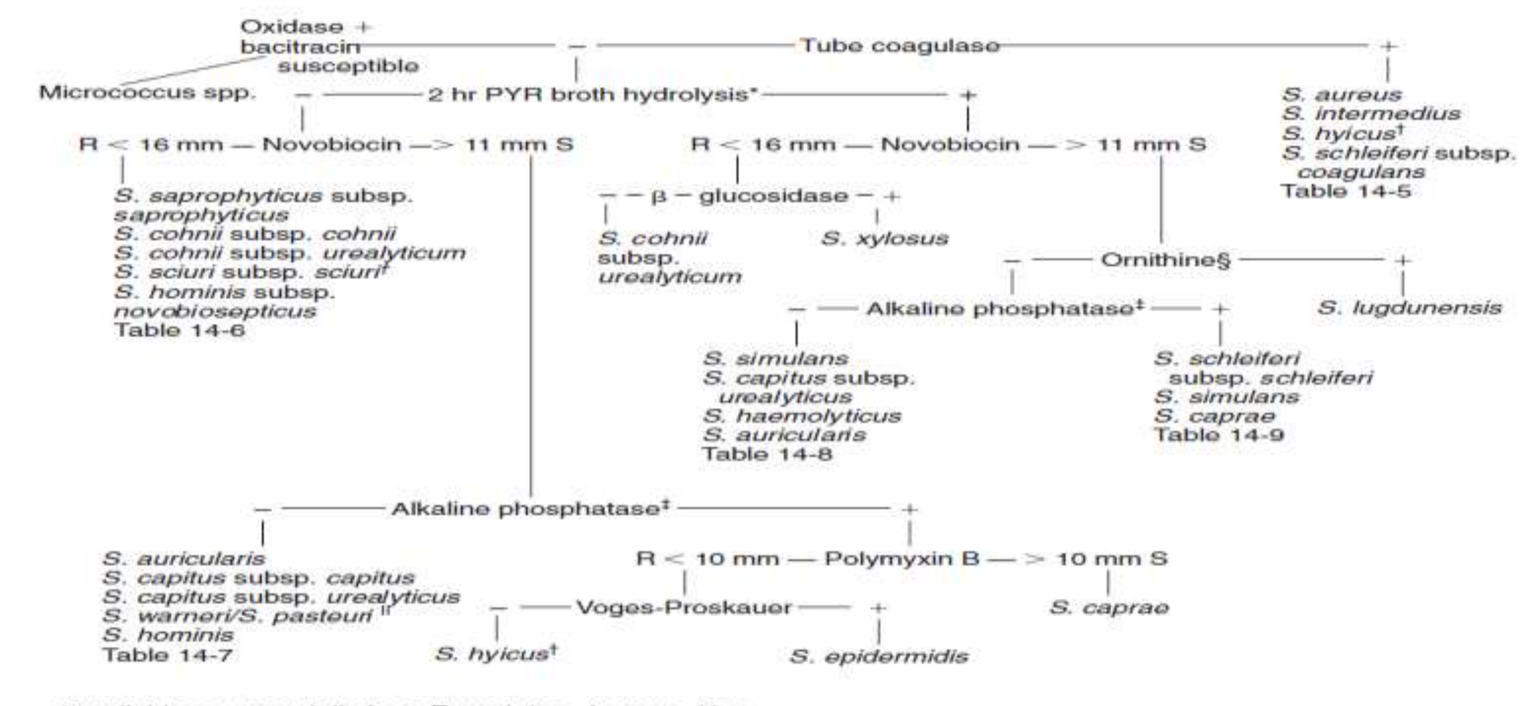
* النتيجة الموجبة : وجود منطقة شفافة حول المستعمرة على الاكار يدل على وجود الانزيم.

* النتيجة السالبة : عدم وجود منطقة شفافة حول المستعمرة على الاكار يدل على عدم وجود الانزيم.



الشكل (٧٢) اختبار Milk Agar المستعمرة الاعلى موجبة الاختبار ، المستعمرة السفلى سالبة الاختبار.

ملحق (١) :الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص انواع بكتريا ***Staphylococcus* spp**



*Available commercially from Remel, Inc., Lenexa, Kan.
†Rarely involved in infections in humans.
‡Alkaline phosphatase available as a disk (Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) or a tablet (KEY Scientific Products, Round Rock, Texas).
§Moeller's decarboxylase medium.
||rRNA gene restriction site polymorphism with pBA2 as a probe may be required to separate these species.

ملحق (٢) الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا الكروية الموجبة لصبغة كرام والسالبة لفحص الكاتليز

Organisms	Gram Stain from Thio Broth	Hemolysis α, β, or non[a]	Cytochrome[b]/ Catalase	Van	LAP	PVR	Gas In MRS Broth	Motility	on BE	In 6.5% NaCl Broth	GROWTH		Comments
											At 10° C	At 45° C	
Leuconostoc	cb, pr, ch	α, non	−/−	R	V	−	+	−	V	V	V	V	
Enterococcus Vancomycin R	c, ch	α, β, or non	−/−[c]	R	+	+	−	−	+	+	+	+	
Streptococcus (all)	c, ch	α, β, or non	−/−	S	+[e]	V[f]	−	−	V[d]	V[h]	−	V	
S. agalactiae	c, ch	β, non	−/−	S	+	−	NT	−	−	V	NT	NT	
S. bovis	c, ch	α, non	−/−	S	+	−	−	−	+	−	−	+	
Viridans streptococci	c, ch	α, non	−/−	S	+	−	−	−	−	−	−	V	
S. urinalis	c, pr, ch	non	−/−	S	+	+	−	−	+	+	−	+	
Abiotrophia	c, ch	α, non	−/−	S	V	V	−	−	−	−	−	V	Satellitism around *S. aureus*
Granulicatella	c, pr, ch	α	−/−	S	+	+	−	−	NT	−	−	V	Satellitism around *S. aureus*
Lactococcus	cb, ch	α, non	−/−	S	+	V	−	−	+	V	+	V[j]	
Dolosicoccus paucivorans	c, pr, ch	α	−/−	S	−	+	−	−	−	−	−	−	
Globicatella sanguinis	c, ch, pr	α, non	−/−	S	−	V	−	−	+	+	+	V	
Vagococcus	c, ch	α, non	−/−	S	+	+	−	+	+	V	+	V	
Lactobacillus	cb, ch	α, non	−/−	V	V	−	V	−	V	V	+	V	
Weissella confusa	Elongated bacilli[k]	α	−/−	R	−	NT	+	V	+	V	NT	+	Arginine positive

A Hemolysis tested on TSA with 5% sheep blood.
B Cytochrome enzymes as detected by the porphyrin broth test.
C Enterococci may produce a positive “pseudocatalase” effervescence. This occurs when *E. faecalis* strains grown on a blood-containing medium are
tested for catalase production

D *Vagococcus fluvialis* is negative for l-arabinose and raffinose، but the motile *Enterococcus gallinarum* is positive for both.
E The most common isolates are positive.
F *S. pyogenes*، *S. pneumoniae*، and *S. urinalis* are PYR positive.
G Five percent to 10% of viridans streptococci and *S. bovis* are bile esculin positive.
H Some beta streptococci grow in 6.5% salt broth.
I Occasional isolates are positive or give weakly positive reactions that are difficult to interpret.
J Majority of strains will not grow at 45° C in less than or equal to 48 hours.
K From blood agar، the organism resembles a gram-positive coccobacillus.
α، alpha-hemolytic; β، beta-hemolytic; BE، bile esculin hydrolysis; c، cocci; cb، coccobacilli; ch، chaining; pr، pairs; LAP، leucine aminopeptidase; MRS،gas from glucose in Mann، Rogosa، Sharp Lactobacillus broth; NT، not tested; PYR، pyrrolidonyl arylamidase; THIO، thioglycollate broth; Van، vancomycin(30 µg) susceptible (S) or resistant (R); +، 90% or more of species or strains are positive; −، 90% or more of species or strains negative; V، variable reactions.

ملحق (٣) الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا Bacillus ، Brevibacillus ، Paenibacillus

Organism	Bacillary Body Width >1 µm	Wide Zone Lecithinase	Spores Swell Sporangium	Voges Proskauer	Glucose with Gas	FERMENTATION OF: Mannitol	Xylose	Anaerobic Growth	Citrate	Indole	Motility	Parasporal Crystals
Bacillus anthracis	+	+	–	+	–	–	–	+	v	–	–	–
B. cereus	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–	+	–
B. thuringiensis	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–	+	+
B. mycoides	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–	–	–
B. megaterium	+	–	–	–	–	+ or (+)	v	–	+	–	+	–
B. licheniformis	–	–	–	+	–	+	+	+	+	–	+	–
B. pumilus	–	–	–	+	–	+	+	–	+	–	+	–
B. subtilis	–	–	–	+	–	+	+	–	+	–	+	–
B. circulans	–	–	+	–	–	+	+	v	–	–	+	–
B. coagulans	–	–	v	v	–	–	v	+	v	–	+	–
Brevibacillus brevis	–	–	+	–	–	+	–	–	v	–	+	v
Paenibacillus macerans	–	–*	+	–	+	+	+	+	–	–	+	–
P. alvei	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+	+	–
P. polymyxa	–	–*	+	+	+	v	+	+	–	–	+	–

***Weak lecithinase production only seen under the colonies.**
+، 90% or more of species or strains are positive; –، 90% or more of species or strains are negative، *v*، variable reactions; ( )، reactions may be delayed.

ملحق (٤) : الفحوصات الكيموحيوية للعائلة المعوية Enterobacteraceae.

											Citrobacter		Klebsiella		Enterobacter				Serratia		Proteus			Providencia		
	Escherichia coli	Ewingella americana	H. alvei	Plesiomonas shigelloides *oxidase +	Shigella sonnei	Other Shigella	S. enteritidis	S. typhi	Edwardsiella tarda	C. freundii	C.braakii	C. koseri (formerly diversus)	K. pneumoniae	K. oxytoxa	E. cloacae	E. aerogenes	Cronobacter sakazakii	Pantoea agglomerans (was Enterobacter)	S. marcescens	S. odorifera biotype 2	P. vulgaris	P. mirabilis	Morganella morganii	P. rettgeri	P. stuartii	Yersinia enterocolitica
Indole	+	−	−	+	−	V	−	−	+	−	−(v)	+	−	+	−	−	−	−(v)	−	V	+	−	+	+	+	V
Methyl red	+	+	−(v)	V	+	+	+	+	+	+	+	+	V	−(v)	−	−	−	V	V	+(v)	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	−	+	+(v)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+(v)	+	+	−	V	−	−	−	−
Simmons' citrate	−	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+(v)	+	+	+	+	+	+	V	+	+	−(v)	+(v)	−	+	+	−
Hydrogen Sulfide (TSI)	−	−	−	−	−	−	+(v)	+w	+	+	+(v)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
Urea	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−(v)	−(v)	+(v)	+	+	+(v)	−	−	−(v)	−(v)	−	+	+	+	+	−(v)	+
Motility	V	+(v)	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+(v)	−
Lysine decarboxylase	+(v)	−	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−
Arginine dihydrolase	−(v)	−	−	+	−	V	+(v)	−	−	+(v)	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Ornithine decarboxylase	+(v)	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	−	+
Phenylalinine deaminase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+(v)	−(v)	−	−	+	+	+	+	+	−
Gas from D–glucose	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−(v)	−	−	+	+	+	−	−	−
Lactose	+	+(v)	−	V	−	−	−	−	−	+(v)	+	V	+	+	+	+	+	−(v)	−	+	−	−	−	−	−	−
Sucrose	V	−	−	−	−	−	−	−	−	+(v)	−	−(v)	+	+	+	+	+	+(v)	+	−	+	−	−	−	V	+
D–Mannitol	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−(v)	+
Adonitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−(v)	+	−	−	−(v)	+(v)	−	−	−	+	−	−
Inositol	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−(v)	+	+	−(v)	V	+	−	−	−	+	+	−
D–Sorbitol	+(v)	−	−	−	−	V	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−(v)	+	+	−	−	−	−	−	+
L–Arabinose	+	−	+	−	+	V	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+
Raffinose	V	−	−	−	−	V	−	−	−	−(v)	−	−	+	+	+	+	+	−(v)	−	−	−	−	−	−	−	−
L–Rhamnose	−	−(v)	+	−	+(v)	−(v)	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+(v)	−	−
KCN, growth in	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	−(v)	+	−	+	+	+	+	+	−
Gelatin (22°C)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−(v)	+	+	+	−	−	−	−
DNase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−

. *V*، Variability can be equally either positive or negative; +(v)، greater probability for positive reaction >50%; −(v)، greater probability for negative reaction >50%; (+)، positive > 80%; (−)، negative > 80%. The pink squares indicate a pattern useful for preliminary recognition. The green squares indicate a key characteristic for biochemical identification.

ملحق (٥): الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Acidovorax*، *Brevundimonas*، *Burkholderia*، *Pseudomonas*

Organisms	Growth at 42°C	Nitrate Reduction	Gas from Nitrate	Gelatin Liquefied	Arginine Dihydrolase	Lysine Decarboxylase	Urea Hydrolysis	Oxidizes Glucose	Oxidizes Lactose	Oxidizes Mannitol	Oxidizes Xylose
Acidovorax delafieldii	v	+	–	–	+	–	+	+	–	v	v
Acidovorax facilis	–	+	–	+	+	–	+	+	–	+	+
Acidovorax temperans	+	+	–	–	–	–	v	+	–	v	–
Brevundimonas diminuta	v	–	–	v	–	–	–	v	–	–	–
B. vesicularis	v	–	–	v	–	–	–	v	–	–	v
Burkholderia cepacia complex	v	v	–	v	+	v	v	+	v	+	v
B. pseudomallei	+	+	+	v	+	–	v	+	+	+	+
B. mallei	–	+	–	–	+	–	v	+	v	–	v
Pandoraea spp.	v	v	–	–	–	–	v	+w	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	v	+	–	v	+	–	v	+
P. fluorescens	–	–	–	+	+	–	v	+	v	v	+
P. mendocina	+	+	+	–	+	–	v	+	–	–	+
P. monteilii	–	–	–	–	+	–	v	+	–	–	–
P. mosselii	–	–	–	+	+	–	ND	+	–	v	–
P. putida	–	–	–	–	+	–	v	+	v	v	+
P. stutzeri	v	+	+	–	–	–	v	+	–	+	+
Pseudomonas veronii	–	+	+	v	+	ND	v	+	ND	+	+
Pseudomonas–like group 2	v	v	–	–	v	–	+	+	+	+	+
CDC group Ic	+	+	–	–	+	–	v	+	–	–	–
Ralstonia insidiosa	+	+	ND	ND	N	–	v	–	v	ND	ND
Ralstonia mannitolilytica	+	–	–	v	–	–	+	+	+	+	+
R. pickettii	v	+	v	v	–	–	+	+	v	–	+

ND**، No data; *v*، variable; +، >90% of strains are positive; –، >90% of strains are negative; *w*، weak.**

ملحق (٦) :الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Haemophilus*

Organism	X Factor	V Factor	Beta-Hemolytic on Rabbit Blood Agar	Catalase	Lactose	Glucose	Xylose	Sucrose	Mannose	β-galactosidase
Haemophilus influenzae	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
H. aegyptius	pos	pos	pos	pos	neg	pos*	neg	neg	neg	neg
H. haemolyticus	pos	pos	pos	pos	neg	pos	V	neg	neg	neg
H. parahaemolyticus	neg	pos	pos	V	neg	pos	neg	pos	neg	V
H. parainfluenzae	neg	pos	V	V	neg	pos	neg	pos	pos	V
H. pittmaniae	neg	pos	pos	pos^{w}	neg	pos	neg	pos	pos	pos
H. paraphrohaemolyticus	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	neg	V
H. ducreyi	pos	neg	neg*	neg	neg	V	neg	neg	neg	neg

+، >90% of strains positive; −، >90% of strains negative; *w*، indicates a weak reaction; *v*، indicates a variable reaction.
***Delayed reactions in some strains**

المصادر

Tille،P.M.(2014). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology، 13th ed، Mosby، Inc.، an affiliate of Elsevier Inc..China.1193PP.

Leboffe،M.J.and Pierce ،B.E.(2010). Microbiology Laboratory Theory & Application ،3th ed ، Morton Publishing Company INC. United States of America.786.PP.

Harley،J.P.and Prescott،L.M..(2002).Laboratory Exercises in Microbiology، 4th ed، The McGraw−Hill Companies INC. United States of America.449PP.

Atlas،R.M.(2010). Handbook of MICROBIOLOGICAL MEDIA. 4th ed. Taylor and Francis Group، LLC. United States of America.2043PP.